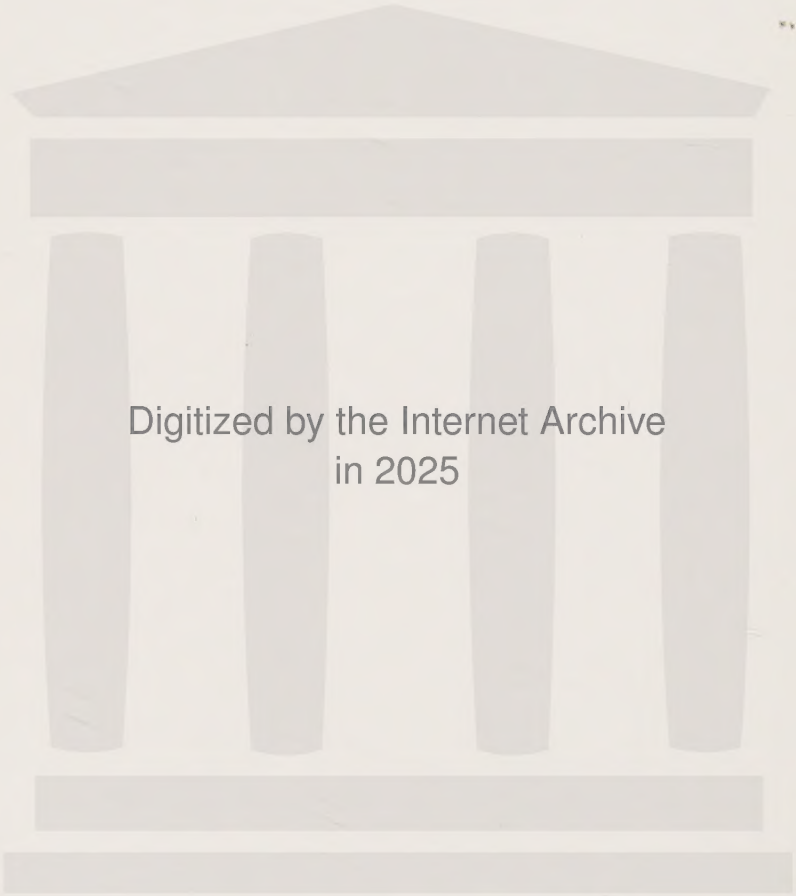
Thesis 1965

OVER ANTIGENE WERKING VAN HETEROLOGE BOTIMPLANTATEN

F. DUIJFJES


Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/overantigenewerk0000fduh

STELLINGEN

I

De weefselreactie die optreedt om implantaten van heteroloog spongieus botweefsel is te beschouwen als een heterotransplantaatreactie.

II

Bij de behandeling van osteochondritis dissecans van de femurcondyl dient men er naar te streven het gewrichtsoppervlak door fixatie van het gesequestreerde fragment te herstellen.

III

Tenosynovitis om strek- en buigpezen van pols en hand bij patienten lijdende aan rheumatoïde arthritis, die bij conservatieve therapie niet volledig verdwijnt of snel recidiveert dient chirurgisch behandeld te worden.

IV

Conservatieve behandeling van frakturen van het tibiaplateau, met behulp van een rekverband en vroegtijdig bewegen van het gewricht, verdient de voorkeur.

V

In het geheel van het onderwijs in de geneeskunde in Nederland verdient de orthopaedie een ruimere plaats.

VI

Over de herkomst van de macrofagen, welke bij spierdegeneratie voorkomen is niets met zekerheid bekend.

VII

Het vóórkomen van het syndroom dysbasia cum dystasia bij hernia nucleus pulposus verdient ruimere bekendheid.

VIII

Bij kinderen lijdende aan vitamine-D resistente rachitis en een ernstige graad van genu varum of genu valgum, is correctie hiervan door remming van de lengtegroei aan een zijde van de groeischijf met behulp van krammen volgens Blount te verkiezen boven correctieve osteotomie.

IX

Indien bij verlamming van de bilspieren door myelodysplasie of poliomyelitis een flexiecontractuur en/of luxatie in het heupgewricht bestaat moet, bij operatieve behandeling hiervan, transpositie van de aanhechting van de musculus ilio-psoas volgens Mustard of Sharrard verkozen worden boven tenotomie van deze spier.

X

Bij kinderen met een ernstige graad van lengteverschil van de benen moet onderbeenverlenging volgens de methode Anderson overwogen worden.

XI

Bij prothesevoorziening na onderbeenamputatie dient de „Patellar Tendon Bearing" prothese beproefd te worden.

OVER ANTIGENE WERKING VAN HETEROLOGE BOTIMPLANTATEN

Een experimenteel onderzoek

PROMOTOR : TH. G. VAN RIJSSEL

Dit onderzoek werd verricht in het Pathologisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Leiden onder leiding van Dr. J. Oort, hoofd van de afdeling voor experimentele pathologie.

De proefdieren werden verzorgd door de Heer A. Wassenaar, die ook steeds uitnemende hulp verleende bij de operaties.

De histologische bewerkingen werden verricht door de Dames J. van Driel, M. E. A. van Zanten-Willemsen en W. L. Panhuysen.

De Dames Mevr. J. C. Kapel-Elskamp en Mevr. G. R. Willemze-Bouwknegt, destijds analysten bij de afdeling voor experimentele pathologie, bereidden de weefselextracten en waren behulpzaam bij het uitvoeren van het immunologische onderzoek.

De statistische bewerking van het materiaal uit Hoofdstuk IV werd uitgevoerd door de afdeling Medische Statistiek der Rijksuniversiteit te Leiden, Hoofd de Heer H. de Jonge.

OVER ANTIGENE WERKING VAN HETEROLOGE BOTIMPLANTATEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. D. J. KUENEN, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN, TEN OVERSTAAN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 28 APRIL 1965 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

F. DUIJFJES
Geboren te Treebeek, Limburg
19 april 1918

DRUKKERIJ „LUCTOR ET EMERGO" — LEIDEN

INHOUD

I Inleiding en vraagstelling 1

II De histologische reactie na implantatie van geconserveerd heteroloog-, gemacereerd heteroloog- en geconserveerd autoloog spongieus botweefsel. 9

Algemene beschrijving van de proefopstelling, bladz. 9, materiaal en methodiek, bladz. 9, beschrijving van de preparaten, bladz. 12, overzicht van de gevonden verschillen, bladz. 17, samenvatting van de resultaten, bladz. 18, conclusie, bladz. 21.

III De invloed van de verschillende componenten van het geconserveerde heterologe botimplantaat. 23

De invloed van heteroloog vet en vetweefsel, bladz. 24, de invloed van heteroloog cellulair materiaal, bladz. 29, conclusies, bladz. 33.

IV De sensibiliserende werking van heteroloog dood botweefsel. 34

Onderzoekmethode: de aktieve en passieve huidanaphylaxie (A.C.A. en P.C.A.), bladz. 35, enkele oriënterende experimenten, bladz. 37, A.C.A.-test en P.C.A.-test na implantatie van 4 schijfjes bot bij proefduur van 7, 10 en 14 dagen, bladz. 42, A.C.A.-test en P.C.A.-test na implantatie van één schijfje bot bij proefduur van 10, 14 en 21 dagen, bladz. 45, P.C.A.-test na implantatie van 2 schijfjes volledig gemacereerde kalfsbot en van het handelspreparaat Kieler Span bij proefduur van 7, 10, 14 en 21 dagen, A.C.A.-test bij dezelfde proefdieren 21 dagen na implantatie, bladz. 49, conclusies, bladz. 51.

V Discussie van de resultaten en conclusies 53

VI Samenvatting 67

VII Summary 71

VIII Literatuur 75

IX Aanhangsel 3

X Afbeeldingen I

HOOFDSTUK I

INLEIDING EN VRAAGSTELLING

Wie aandoeningen van het skelet chirurgisch behandelt, moet vaak gebruik maken van bottransplantatie. Men doet dit onder meer bij het opvullen van holten in beenderen, het verstijven van ziekelijk veranderde pijnlijke gewrichten, de behandeling van traag genezende fracturen of pseudoarthrosen en het vervangen van gedeelten van pijpbeenderen, die door operatie of trauma verloren gingen.

Naar herkomst deelt men de bottransplantaten als volgt in: botweefsel afkomstig van het individu zelf = autoloog bot; van een genetisch identiek individu = isoloog bot; van een individu van dezelfde soort = homoloog bot; of van een individu van een andere diersoort = heteroloog bot.

Een andere indeling is die naar de toestand van het transplantaat. Het botweefsel kan levend, direct nadat het uit de samenhang met het skelet werd losgemaakt, verplant worden. Het kan langere of kortere tijd bewaard worden onder omstandigheden, waarin weefselbederf wordt voorkomen, b.v. door bevriezing; geconserveerd bot. Ook kan het zo worden bewerkt, dat de aan bederf onderhevige componenten eraan worden onttrokken; gemacereerd bot. In de beide laatste gevallen wordt dood weefsel ingebracht en men spreekt dan beter van implantaat dan van transplantaat.

Ook na transplantatie van levend autoloog of homoloog botweefsel blijken de osteocyten voor het allergrootste deel spoedig te gronde te gaan. Alleen cellen van periost en endost kunnen na de transplantatie in hun nieuwe omgeving deelnemen aan de weefselformatie, een proces dat bij homologe transplantaten weldra, tegelijk met het optreden van de „homograft"-reactie, een einde neemt. Wat het botweefsel in engere zin betreft, botsubstantie met osteocyten, is er afgezien van de eerste dagen na de transplantatie waarschijnlijk geen onderscheid tussen een transplantaat en een implantaat.

Klinisch en histologisch succes na bottransplantatie betekent, dat na

verloop van tijd levend botweefsel wordt aangetroffen op de plaats waar het implantaat werd aangebracht, en dat dit botweefsel een functionele samenhang met de aangrenzende skeletdelen vertoont.

Er zijn na gebruik van vrijwel alle genoemde botsoorten successen beschreven, zowel bij experimenteel onderzoek als bij klinisch gebruik. Men heeft, met behulp van gegevens die door experimenteel onderzoek met proefdieren en door klinische observatie verkregen werden, de verschillende transplantaatsoorten gerangschikt naar hun klinische bruikbaarheid (o.a. Lentz 1955). Autoloog vers weefsel blijkt de grootste kans op succes te geven. Van verschillende implantaatsoorten (dood botweefsel) acht men geconserveerd autoloog bot het beste. Geconserveerd homoloog bot staat hier dicht bij. Vers homoloog en geconserveerd heteroloog bot blijken minder goed bruikbaar en de kans op mislukken zou bij gemacereerd bot het grootst zijn. De superioriteit van vers autoloog bot wordt toegeschreven aan vorming van nieuw botweefsel door verplante cellen afkomstig van endost en periost, aan inductie van botvorming in jong bindweefsel in de omgeving en aan ontbreken van elke afweerreactie van het weefsel dat het spaanbed vormt.

Het gebruik van verse autologe implantaten heeft echter ook bezwaren. In vele gevallen is een afzonderlijke operatie nodig voor het verkrijgen van het transplantaat. Bij kinderen vooral kan men soms niet voldoende bot wegnemen zonder een onverantwoorde verzwakking van de donorplaats. Heeft men véél transplantatiemateriaal nodig, dan moet men de operatieve ingreep soms beperken tot het nemen van dit weefsel, omdat de toestand van de patint langer opereren niet toelaat.

Botvorming door het getransplanteerde weefsel zelf is blijkbaar in vele gevallen niet noodzakelijk voor het slagen van de transplantatie-operatie, zodat ook dode botimplantaten bruikbaar kunnen zijn. Sinds 1940 vindt men in de literatuur vele mededelingen over gevallen, waarin geconserveerd bot gebruikt werd. De conservering geschiedt meestal door bevriezen en het gebruikte bot is gewoonlijk homoloog, soms heteroloog.

Welke rol speelt een dergelijk dood implantaat bij een geslaagde botimplantatie?

Wij moeten voorop stellen, dat deze implantaten niet zelf deel gaan uitmaken van de levende weefselstructuur. Zelfs bij verse autologe implantaten wordt de ingebrachte botsubstantie geheel afgebroken en vervangen door nieuwgevormd levend botweefsel, een proces dat bij compact bot zeer langzaam verlopen kan, zodat men nog na jaren in

het nieuwe levende botweefsel eilanden van de dood bot aantreft. Bij dode implantaten worden ook meeverplant periost en merg afgebroken. Voor het slagen van een bottransplantatie moet juist de plaatselijke vorming van nieuw levend botweefsel, dat het verplante bot tenslotte zal vervangen, essentieel geacht worden.

Sommige onderzoekers menen, dat een botimplantaat, of bepaalde stoffen hieruit, de osteogenese aanzetten en zelfs jong bindweefsel veranderen in botvormend weefsel (Levander 1946). Dit laatste wordt door Lacroix (1951) beschouwd als gevolg van inductie. Dat botvorming ten gevolge van inductie kan voorkomen is zeker waarschijnlijk gemaakt. Men ziet echter om dode botimplantaten geplaatst in een weefsel dat gewoonlijk geen bot vormt (hererotope implantatie) geen, of maar zeer geringe, vorming van botweefsel. Voor de praktijk lijkt deze werking van de implantaten van weinig betekenis. Men moet o.i. aannemen, dat het levende botweefsel, dat na een gesiaagde implantatie op de plaats van een botwond wordt aangetroffen, daar gevormd werd door die cellen van het omgevende weefsel, die bij de normale osteogenese zijn betrokken (osteoblasten).

Een tweede opvatting over de rol van een implantaat is, dat het als steiger dient voor het jonge prolifererende beenvormende weefsel.

Berg (1948) wees op een derde mogelijkheid, n.l. dat een implantaat de plaats waar botweefsel moet ingroeien, beschermt tegen prolifererend fibreus bindweefsel.

Het is duidelijk dat voor aanhangers van de beide laatste opvattingen, de structuur van het verplante botweefsel belangrijk is en dat spongieus bot de voorkeur zal verdienen boven compact bot.

Dood beenmerg moet o.i. volgens de beide laatst genoemde theoriën storend werken, doordat binnengroeien van het gastheerweefsel in de implantaten erdoor belemmerd wordt. Ook is het waarschijnlijk, dat dit dode celmateriaal de locale reactie van het gastheerweefsel beïnvloedt en een ontstekingsreactie met bindweefselwoekering kan veroorzaken, wat de proliferatie van de osteoblasten zou kunnen belemmeren. Het is mogelijk dat bij homologe of heterologe implantatie de antigene werking van soortvreemde eiwitten hierbij een rol speelt. Ontbreken van dood merg in de implantaten zou een gunstig effect moeten hebben en men mag verwachten, dat botsubstantie die van beenmerg gezuiverd is, een goed bruikbare implantaatsoort zou vormen, zeker niet slechter dan geconserveerd homoloog of heteroloog bot. En toch heeft men tot enkele jaren geleden steeds weer moeten constateren dat juist gemacereerd bot van alle tot nu toe genoemde vormen van bottransplanaat klinisch het

minst bruikbaar is. Een nieuwe maceratiemethode die door Bauermeister (1958) ontwikkeld werd, zal misschien herziening van dit afwijzende oordeel nodig maken.

In 1958 publiceerde deze onderzoeker een experimenteel onderzoek naar de bruikbaarheid van gemacereerd heteroloog botweefsel voor implantatie. Aanleiding tot dit onderzoek waren de moeilijkheden die zich voordoen bij het in voorraad houden van geconserveerd homoloog botweefsel voor klinisch gebruik (de z.g. beenbank) en die vooral het verkrijgen van het botmateriaal en de dure en kwetsbare inrichting voor de conservering betroffen. Gebruik van gemacereerd botweefsel, afkomstig van kalf of varken, zou deze problemen kunnen vereenvoudigen. De grondstof is gemakkelijk te verkrijgen en goed gemacereerd botweefsel is in droge toestand, ook bij kamertemperatuur, vrijwel onbeperkt houdbaar.

De slechte klinische en experimentele ervaringen met gemacereerd bot meent Bauermeister te moeten toeschrijven aan de toegepaste maceratiemethoden, die slecht gestandaardiseerd waren, zodat de zuivering van het gebruikte botweefsel zeer ongelijk moet zijn geweest. Ook zou het gebruik van toxisch werkende chemische stoffen, die, òf niet voldoende verwijderd waren òf een verbinding met de botmatrix aangingen nadelig kunnen zijn. Verder zou de verhitting, die voor het maceratieproces zelf òf voor de sterilisatie van het product nodig was een rol kunnen spelen, o.a. omdat hierbij coagulatie van eiwitten kan optreden hetgeen volledige maceratie onmogelijk maakt. Bovendien vermoedde Bauermeister, dat door de verhitting de ,,osteogene potentie" van het botweefsel verloren zou gaan. Onder ,,osteogene potentie" verstaat hij het vermogen van een botimplantaat om aangrenzend ongedifferentieerd jong bindweefsel tot vorming van bot te brengen.

Een nieuwe, door Bauermeister, ontwikkelde methode van botmaceratie zou al deze schadelijke factoren missen. Kort samengevat komt deze methode neer op het volgende. Met behulp van waterstofperoxyde wordt het bot langs oxydatieve weg onteiwit. Daarna wordt het ontvet in stromende aetherdamp. Tijdens de hele bewerking stijgt de temperatuur niet boven 40° C. De ontvetting is zeer radicaal en bij deze bewerking blijkt het botstuk bovendien gesteriliseerd te worden. Dit laatste wordt toegeschreven aan het oplossen van de lipoïden in de celmembranen van de bacteriën, waardoor deze vernietigd worden.

Bij lang voortzetten van de bewerking met H_2O_2 blijkt ook de bottussenstof sterk te worden aangetast, zodat het bot erg bros wordt. Waarschijnlijk is dan het collageen uit de bottussenstof grotendeels ver-

wijderd. Het bleek mogelijk, door beperken van de duur van deze bewerking een goede zuivering te verkrijgen met behoud van voldoende stevigheid. Een groot deel van de collagene vezels in de bottussenstof moet dan nog gespaard zijn en men spreekt daarom van eiwitarm bot. De graad van zuivering wordt beoordeeld bij opvallend en doorvallend licht. De kleur moet wit zijn en spongieus bot moet bij doorvallend licht wit of lichtgrijs zijn. Microscopisch onderzoek van het maceraat zou niet goed mogelijk zijn, daar er na ontkalken weinig zou overblijven. De afbeeldingen van microscopische praeparaten in de publicatie van Bauermeister (1958) bevestigen deze opvattingen echter niet. Zeer vaak treft men vele normaal gevormde botbalkjes aan met lege botlacunen.

Uit een groot aantal implantatieproeven bij honden met op deze manier gemacereerd bot afkomstig van kalf, rund, big, varken, hond en mens, waarbij ter vergelijking ook verse autologe en homologe bottransplantaten gebruikt werden, trok Bauermeister de volgende conclusies:

1. in de dierproef wordt hetzelfde resultaat bereikt — o.a. wat betreft de botvorming om en in de implantaten — bij gebruik van gemacereerde autologe, homologe of heterologe implantaten, gemaakt uit bot van volwassen individuën.
2. homologe en heterologe gemacereerde implantaten zijn, bij implantatie in een botwond, beter dan homologe door bevriezen geconserveerde implantaten.
3. het gemacereerde heterologe bot verwekt geen afweerreactie van de gastheer.
4. bij implantatie van gemacereerd bot in de weke delen wordt na een implantatieduur van 10 en 15 dagen een levendige callusvorming om, en substitutie van het implantaat gevonden.
5. homoloog en heteroloog vet heeft dezelfde betekenis voor het opwekken van afweerreacties van de gastheer als homoloog en heteroloog eiwit.

Zijn eindconclusie is, dat volgens deze methode gemacereerd bot het beste vervangingsmiddel voor vers autoloog bot blijkt te zijn, dat op het ogenblik beschikbaar is.

Hoewel Bauermeister herhaaldelijk spreekt van „heterologe" en „antigene" werking van soortvreemd eiwit in niet-gemacereerde botstukken als mede oorzaak van waargenomen afweerreacties, doet hij geen poging om die antigene werking aan te tonen. Uit de gelijke gastheerreacties op implantaten van gemacereerd autoloog, homoloog en heteroloog botweefsel wordt de conclusie getrokken, dat de heterologe werking door maceratie opgeheven is. De proefduur werd door Bauermeister beperkt

tot 10 en 14 dagen, omdat bij implantatie in een holte gemaakt in spongieus bot (Maatz 1953) de verschillen tussen de implantaatsoorten bij kortere duur niet duidelijk waren en bij langer voortzetten door de sterke botvorming vanuit het spaanbed ook weer vervaagden. Ons inziens zal daarom het begin en beloop van de reactieve processen onderzocht moeten worden aan implantaten in niet botvormende omgeving, dus bij z.g. heterotope implantatie. Dergelijke heterotope implantatie werd door Bauermeister uitsluitend gedaan in spierwonden, en botvorming in een dergelijk milieu wordt door hem gewaardeerd als bijzonder gunstig en bewijzend voor een behouden „osteogene potentie". Het is echter bekend, dat beschadiging van spierweefsel, vermoedelijk na spiernecrose, tot heterotope botvorming kan leiden. Men zou dus ook een beschadigende invloed van het implantaat of van de implantatie ter verklaring van deze botvorming kunnen aannemen.

Een bijzondere betekenis van het soortvreemde vet voor de reactie op heterologe niet gemacereerde implantaten, zoals gepostuleerd door Bauermeister, wordt uit de beschreven proeven niet duidelijk.

Onze aandacht werd op dit nieuwe maceratie-procédé gevestigd door Dr. M. J. Kingma te Amsterdam. Deze was geïnteresseerd in de bruikbaarheid van dit botmateriaal voor de beenbank van het Nederlandse Rode Kruis. De beenbank leverde kalfsbot, dat onder steriele omstandigheden verkregen en door bevriezing geconserveerd werd. De klinische ervaring met dit heterologe geconserveerde bot bleek echter teleurstellend en in het geheel niet te beantwoorden aan de, vooral door Franse onderzoekers gewekte, verwachtingen (Kingma 1960). Maar al te vaak blijken deze implantaten door een bindweefselkapsel omgeven te worden en in de beenwond waarin zij werden aangebracht buiten het regeneratieproces te blijven, terwijl zij daar juist stimulerend zouden moeten werken. Deze afkapseling moet men waarschijnlijk zien als een uiting van afweer van de kant van de gastheer. Welke factoren in het heterologe bot deze reactie veroorzaken is niet nauwkeurig bekend.

Aan het beproeven van volgens Bauermeister gemacereerd kalfsbot in de kliniek moest ons inziens een experimenteel onderzoek vooraf gaan, waarin de weefselreactie op dit botimplantaat en die op door diepvriezen geconserveerd bot van dezelfde donor vergeleken wordt, om na te gaan welke reactie door het bevroren bot veroorzaakt wordt en of deze reactie bij gemacereerd bot ontbreekt of zwakker is. Blijkt dit laatste het geval, en dit mogen wij uit het onderzoek van Bauermeister verwachten, dan rijst de vraag of de reactie op het geconserveerde heterologe bot samen-

hangt met antigene werking van weefselcomponenten in dit bot die door de maceratie weggenomen worden.

Toen dit onderzoek ontworpen werd, was het uit orienterende proeven van Kingma (gepubliceerd in 1964) waarschijnlijk geworden dat transplantatie van gemacereerd compact bot in een botwond (defect in de lamina externa van het ilium van konijnen) niet aan de verwachtingen van Bauermeister zou beantwoorden. Wij besloten om de volgende redenen spongieus bot te onderzoeken. In de kliniek geven wij bij bottransplantatie de voorkeur aan deze vorm van weefsel wanneer het om het stimuleren van botvorming te doen is (Matti 1932; Mowlem 1945). Bij autoloog vers weefsel rekenen wij dan op botvorming door elementen van endost en merg. In gemacereerde vorm zal het spongieuze bot de functie van steiger waarop boven gewezen werd, vermoedelijk beter vervullen dan compact bot. Bovendien is het waarschijnlijk, dat de intensiteit van de weefselreactie beïnvloed wordt door de afmetingen van het botoppervlak waarmee de gastheerweefsels in contact kunnen komen en dit oppervlak is, bij implantaten van gelijke afmeting, bij spongieus bot vele malen groter dan bij compact bot. Men mag daarom verwachten dat een geringe weefselreactie bij gebruik van spongieus bot beter waar te nemen zal zijn. Voor het beoordelen van de fijnere details van de gastheerreactie ook bij langere implantatie-duur dan Bauermeister gebruikte, is implantatie in een botwond minder geschikt. Daarom werd implantatie in weke delen verkozen, waarbij vermeden werd een belangrijke spierwond te maken.

Uitgangspunt bij het in dit proefschrift beschreven onderzoek waren de volgende twee vragen:

1. is er histologisch verschil in de weefselreactie van een proefdier op implantatie van
   a. door diepvriezen geconserveerd heteroloog kalfsbot en
   b. door bewerking met H_2O_2 en aetherdamp gemacereerd kalfsbot?
2. indien er constante en duidelijke verschillen gevonden worden, zijn deze dan toe te schrijven aan verschillen in antigene eigenschappen en sensibiliserende werking van de beide implantaatsoorten?

Ter beantwoording van de eerste vraag zijn implantatieproeven bij cavia's verricht. Stukjes kalfsbot van constante vorm en afmeting werden onder de huidspier van het proefdier ingeplant. Elk proefdier kreeg een aantal gelijksoortige implantaten, die na een verschillend aantal dagen werden verwijderd voor histologisch onderzoek. Dit onderzoek wordt beschreven in hoofdstuk II.

De reactie op geconserveerd kalfsbot bleek duidelijk te verschillen van die op gemacereerd kalfsbot. De verschillen bij een implantatieduur van 7 en 10 dagen bleken echter een geheel ander karakter te hebben als die bij een duur van 14 en 21 dagen. Deze waarneming wierp de volgende vraag op:

3. door welke componenten van het geconserveerde bot worden de beide reactievormen veroorzaakt?

Deze vraag wordt behandeld in hoofdstuk III.

Een antwoord werd gezocht, door het maken van onderscheid tussen de botsubstantie, de cellulaire beenmergelementen en het vet in dit beenmerg. De invloed van de volgende implantaten werd onderzocht: a. ontvet geconserveerd kalfsbot; b. kalfsvetweefsel; c. gemacereerd bot, waaraan kalfsvet is toegevoegd; d. kalfsthymusweefsel; en e. gemacereerd bot waaraan kalfsthymus is toegevoegd. In deze proeven werd kalfsthymusweefsel gebruikt als vervangingsmiddel voor vetvrij beenmergweefsel.

De tweede vraag wordt behandeld in hoofdstuk IV. Dit onderzoek was gericht op het bij de proefdieren aantonen van antilichamen tegen antigenen uit kalfsweefsel, na implantatie van de beide botsoorten. Er werd gebruik gemaakt van de actieve en passieve huidanaphylaxie, waarbij tevens een kleurstof in de circulatie gebracht werd om de huidreactie beter afleesbaar te maken. Voor dit onderzoek moest tevoren de vraag beantwoord worden of sensibilisatie van de cavia na één enkele implantatie van door bevriezen geconserveerd kalfsthymusweefsel, met behulp van deze technieken kan worden aangetoond.

Ook de bij dit onderzoek naar sensibilisatie van de proefdieren ingebrachte implantaten werden histologisch onderzocht. Het gemacereerde bot dat in deze proeven gebruikt was, bleek minder volledig gezuiverd geweest te zijn dan dat uit de proeven in hoofdstuk II. Dit wierp de vraag op:

4. werd de zwakkere, maar toch positieve sensibilisatie bij implantatie van dit gemacereerde bot veroorzaakt door beenmergresten in de implantaten of oefende de bottussenstof een antigene werking uit?

Ter beantwoording van deze laatste vraag werden de anaphylaxieproeven herhaald met hetzelfde gemacereerde bot, dat echter nogmaals met H_2O_2 was bewerkt. Daarnaast werden ter vergelijking proeven gedaan met implantatie van het handelspraeparaat, dat door de firma Braun volgens de aanwijzing van Bauermeister vervaardigd wordt.

HOOFDSTUK II

DE HISTOLOGISCHE REACTIE

In dit hoofdstuk wordt een antwoord gezocht op de eerste in het voorafgaande hoofdstuk gestelde vraag: Is er een histologisch verschil in de locale reactie van een cavia op implantatie van kalfsbot, dat door diepvriezen is geconserveerd en van kalfsbot, dat door bewerking met H_2O_2 en aetherdamp is gemacereerd?

Algemene beschrijving van de proefopstelling

Schijfjes spongieus bot met een standaard-afmeting werden bij cavia's geïmplanteerd in de weefsellaag vlak onder de huidspier. Elk proefdier droeg een aantal implantaten. Deze werden samen met de omgevende weke delen na een aantal dagen verwijderd en wel zó, dat de reactie van eenzelfde proefdier op de onderzochte botsoort kon worden nagegaan op verschillende tijden na de implantatie.

Al het heterologe botweefsel dat in deze proeven gebruikt werd, was afkomstig van één kalf. Individuele verschillen van de kant van de donor hoeven daarom bij de beoordeling van de uitkomsten geen punt van overweging te vormen.

Bovendien kregen enkele dieren stukjes van de eigen, door bevriezen geconserveerde, femurschacht. De reactie die geconserveerd autoloog botweefsel opwekt, kon hierdoor worden vergeleken met de reactie op het gemacereerde en geconserveerde heterologe bot.

Materiaal en methodiek

Proefdieren. Als proefdieren werden cavia's gebruikt, afkomstig van het centraal proefdierenbedrijf T.N.O. Zeist. De dieren wogen ± 200 gram. Het geslacht werd genoteerd, doch het bleek geen invloed op de

aard of sterkte van de weefselreactie te hebben. De dieren werden afzonderlijk of twee tesamen gehouden in metalen kooien. Er werd dagelijks gevoerd met groenvoer en konijnenkorrel, driemaal per week kregen de dieren hooi, tweemaal per week werd water met vitamine C gegeven. De luchttemperatuur werd constant op 22° gehouden. Mannetjes en wijfjes werden steeds gescheiden gehouden.

Botsoorten.

a. geconserveerd kalfsbot. Dit bot was afkomstig van een steriele slachting voor de beenbank van het Rode Kruis te Amsterdam. Het werd door snel bevriezen tot — 58° C. geconserveerd en daarna bewaard bij — 20° C. Dit bot wordt verder aangeduid als Diepvries-Bot (D.V.-bot).

b. gemacereerd kalfsbot. Bot van het kalf, dat het D.V.-bot leverde is volgens de methode Bauermeister (zie hoofdstuk I) voor ons gepraepareerd door dr. G. C. A. Mastenbroek, hoofd van de Beentransplantatiedienst van het Nederlandse Rode Kruis te Amsterdam. Het botweefsel werd dus door oxydatie met een H_2O_2 oplossing eiwitarm gemaakt en daarna in stromende aetherdamp ontvet. Dit bot werd droog steriel bewaard bij kamertemperatuur. Het wordt verder aangeduid als H_2O_2-bot. Het H_2O_2-bot heeft macroscopisch vorm en structuur bewaard. Het is wit van kleur en vrij bros, maar kan toch gemakkelijk tot schijfjes gezaagd worden.

c. geconserveerd autoloog caviabot. Dit bot werd verkregen van een tweetal cavia's. Nadat de dieren in aethernarcose gebracht waren, werd de linker femurschacht door een laterale, de spieren sparende incisie, benaderd en door afschuiven van het periost blootgelegd. De spieraanhechtingen werden hierbij doorgesneden. De dijbeenhals werd gekliefd en het beenstuk werd distaal ter hoogte van de epiphyseschijf doorgeknipt. De huidwond werd gesloten met agrafes. Deze implantaten waren steeds kleiner van afmeting dan de heterologe implantaten en zij bevatten naast spongieus steeds ook compact botweefsel.

Het botstuk is direct in een steriele met een rubberstop afgesloten glazen buis in de vrieskast geplaatst bij — 20° C. en bleef daar 3 weken. De eerste dagen na de operatie sleepten de dieren de geopereerde poot mee. Hun gedrag was verder niet afwijkend. Later werd de poot weer normaal onder het lichaam gebracht en vanaf de derde week ook weer gebruikt bij het lopen.

Botimplantaten. De heterologe implantaten hadden de vorm van een rond schijfje met een diameter van 8 mm. en een dikte van ± 1 mm. Zij

bestonden uit spongieus bot. Bij de vervaardiging gebruikten wij een langzaam draaiende handfrais en een handzaagje. De schijfjes D.V.-bot werden in de vrieskast (— 20°) bewaard en direct voor de implantatie weer ontdooid.

Bacteriologische controle. Zaagsel en blokjes botmateriaal afkomstig van elke bewerking van implantaten werden telkens bacteriologisch onderzocht, in totaal 21 keer. Eenmaal werd een haemolytische staphylococcus aureus, coagulase positief, gekweekt. De op deze dag vervaardigde implantaten zijn buiten beschouwing gelaten. De overige onderzochte monsters waren bacteriologisch steriel.

De bacteriologische controle is verricht in het Laboratorium voor Tropische Hygiëne van de Rijksuniversiteit te Leiden, hoofd destijds Prof. Dr. E. H. Dinger.

Plaats van implantatie. Dit was de laag losmazig bindweefsel, gelegen tussen de huidspier en de fascie, die de rugspieren bedekt. De implantaten zijn daar goed palpabel.

Techniek van implanteren. Het proefdier werd in aethernarcose geopereerd. Na scheren en joderen van de huid volgde incisie door huid en huidspier in de mediane lijn van het lichaam aan de rugkant. Van deze wond uit werd naar links en rechts naar craniaal en caudaal de huidspier stomp gescheiden van de spierfascie, zodat een viertal zakjes gevormd werden. In elk zakje werd een botschijfje geplaatst. Het implantaat blijft bij deze techniek op ruime afstand van de operatiewond in de huid en van de andere implantaten. De vaatrijkdom in de gekozen weefsellaag is gering. Er trad vrijwel nooit bloeding van enige betekenis op. De huidwond werd gesloten met agrafes en bedekt met een laagje collodion.

Het aantal implantaten per proefdier. In de meeste proeven werden 4, bij een enkele reeks proefdieren 5, implantaten ingebracht. De 4 implantaten werden uitgenomen na 7, 10, 14 en 21 dagen, de 5 implantaten na 2, 4, 21, 60 en 120 dagen. Per proefdier werd steeds één enkele implantaatsoort gebruikt.

Het uitnemen der implantaten. Het proefdier werd in narcose gebracht. De huid boven het implantaat werd geëpileerd en bestreken met een 2% jodiumoplossing. Daarna werd het implantaat omsneden en in samen-

hang met het omringende weefsel, inclusief de huid en de oppervlakkige laag van de rompspier, weggenomen. De huid werd met agrafes gesloten. Bij elk proefdier werden de implantaten één voor één, telkens na een andere implantatieduur weggenomen. Hierdoor kon de reactie van eenzelfde proefdier op één implantaatsoort op verschillende tijden bestudeerd worden.

Tijdstip van uitnemen der implantaatsoorten.
a. heteroloog bot: 2, 4, 7, 10, 14, 21, 60 en 120 dagen na implantatie.
b. autoloog bot: 7, 10, 14 en 21 dagen na implantatie.

Aantal praeparaten per tijd na implantatie. Dit bedraagt voor de heterologe implantaten in het algemeen 6. Een uitzondering vormen de implantaten van gemacereerd bot bij een proefduur van 120 dagen. Deze waren in een aantal gevallen niet terug te vinden. Het aantal autologe implantaten van elke implantatieduur is 2.

Opgemerkt dient te worden, dat bij de gevolgde methodiek de totale massa geïmplanteerd bot, die het proefdier draagt, op elk tijdstip van uitnemen verschillend is. Het moet a priori mogelijk geacht worden, dat de hoeveelheid heteroloog weefsel die in een dier aanwezig is de gastheerreactie beïnvloedt. Wij hebben de indruk dat deze factor voor onze proeven niet van belang was, omdat in de experimenten beschreven in hoofdstuk IV, waarbij elk dier maar een of twee botschijfjes droeg, geen afwijkende histologische beelden gevonden werden.

Bewerking der praeparaten. Zodra een weefselstukje uitgenomen was werd het gefixeerd in 4% formaline oplossing. Vervolgens werd ontkalkt met mierenzuur en natriumformiaat en, na doorvoeren door alcohol-toluol, ingebed in parafine. Gesneden werd loodrecht op het vlak van het botschijfje ongeveer door het centrum ervan in coupes van 6 μ. De coupes werden gekleurd met haematoxiline-eosine.

Beschrijving van de microscopische preparaten

De hiernavolgende beschrijving van de preparaten geeft het gemiddelde beeld na een gegeven implantatieduur. De gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel I, IA en IB op blz. 3, 4 en 5 van het aanhangsel.

A. De microscopie van de D.V.-bot implantaten

D.V.-bot implantaat *vóór implantatie:* (Fig. 1, pag. III) spongieus botweefsel met vet- en haematopoëtisch merg. De osteocyten en de beenmergcellen zijn sterk geschrompeld. De kernen zijn pycnotisch en donker gekleurd. Het vetweefsel is goed geconserveerd. De ontkalkte botbalkjes kleuren rose. Sommige balkjes bevatten centraal blauw gekleurde partijen, de verkalkte tussenstof van het kraakbeen afkomstig van de groeischijf.

D.V.-bot *2 dagen* na implantatie: het implantaat is nog geheel als voor de implantatie. Het gastheerweefsel ligt op sommige plaatsen direct tegen het implantaat aan. Op andere plaatsen is er een smalle zone tussen gastheerweefsel en implantaat, die gevuld is met fibrinedraden waartussen weinig granulocyten. Het gastheerweefsel in de directe omgeving van het implantaat bevat enkele grote cellen met een grote donker gekleurde kern in intens kleurend protoplasma: geprikkelde fibroblasten en histiocyten.

D.V.-bot *4 dagen* na implantatie: oppervlakkig in het implantaat liggen granulocyten in de weefselschotten tussen de vetcellen. Fibroblasten en histiocyten kunnen hier niet zeker herkend worden. De grenslaag tegen het implantaat bestaat uit jong bindweefsel met capillairen en een enkele kleine bloeding. Deze laag is dun en toont, evenals de omgevende losse bindweefsellaag tot aan de spierlagen toe, matige granulocyteninfiltratie.

D.V.-bot *7 dagen* na implantatie: de granulocyten in de weefselschotten tussen de vetcellen worden dieper in het implantaat aangetroffen. Meer perifeer is op enkele plaatsen in deze schotten granulatieweefsel, bestaand uit jong bindweefsel met veel capillairen en geringe vezelvorming te zien. Aan de periferie van het implantaat liggen tegen botbalkjes en vooral tegen losse botfragmentjes, talrijke reuzencellen met vele kernen. Een dikke laag zeer cel- en capillairrijk granulatieweefsel ligt tussen implantaat en spierlagen (fig. 3, p. III). Hierdoor is de afstand tussen spierlagen en implantaat belangrijk groter geworden dan in vorige preparaten: het implantaat wordt omgeven door een granulatiewal. Het voorkomen van een dergelijke wal noemen wij verder *walreactie*. De granulocyteninfiltratie in deze laag is gering. Het spierweefsel toont in de naar het implantaat gekeerde zijde plaatselijk vermeerdering van interstitiele cellen. De meeste botlacunen bevatten nog sterk geschrompelde, meer afgeronde en donker paars kleurende kernen. Soms treft men in plaats daarvan een aantal donker kleurende korrels aan. De

kernen van het dode beenmerg, daar waar geen gastheerweefsel is binnengedrongen, tonen dezelfde veranderingen.

D.V.-bot *10 dagen* na implantatie: bindweefselcellen en capillairen zijn verder in het implantaat doorgedrongen en bereiken in de meeste implantaten op enkele plaatsen het centrum. De vetcellen blijven echter onveranderd, zodat bij kleine vergroting de indruk van „normaal beenmerg" gewekt wordt. Granulocytenpenetratie gaat nog steeds aan de weefselpenetratie in het implantaat vooraf. Het aantal granulocyten blijft gering. Er worden aan de periferie van het implantaat veel meerkernige reuzencellen gezien, meestal in contact met de bottussenstof. Een enkele reuzencel ligt in het implantaat, daar waar de weefselpenetratie het meest gevorderd is. De ruimte tussen implantaat en spierlagen wordt weer ingenomen door granulatieweefsel (fig. 5, p. III). De wal is meestal dunner dan na 7 dagen implantatieduur. Door het verloop van de capillairen en door de vezelvorming evenwijdig aan het oppervlak van het implantaat, gaat dit weefsel een geslaagde structuur evenwijdig aan het implantaatoppervlak vertonen. De granulocyteninfiltratie in deze laag is matig. Er worden weinig lymphocyten aangetroffen. De interstitiële celwoekering in de spierlagen is verminderd. Het dode mergweefsel toont, daar waar geen penetratie van gastheerweefsel optrad, nu meest slecht kleurbare of geen paarse kleur aannemende kernen. Hier en daar vindt men echter nog donker kleurende, of in donker kleurende korrels uiteengevallen, kernmassa.

D.V.-bot *14 dagen* na implantatie (fig. 7, p. V): het implantaat is meestal geheel doorgroeid met een vrij celrijk jong bindweefsel, dat duidelijk vezels in de tussenstof vertoont. Dit jonge bindweefsel ligt tegen de onveranderde botbalkjes aan. Enkele implantaten tonen centraal nog gebieden onveranderd dood merg. De meeste vetcellen zijn opgeruimd. In de omgeving van nog resterend vet vindt men schuimcellen. Talrijke veelkernige reuzencellen worden aangetroffen, nog steeds overwegend in de periferie van het implantaat. Het weefsel in en vlak om het implantaat is op vele plaatsen geïnfiltreerd met rondkernigen, waarbij steeds plasmacellen, soms in groepjes bijeen liggend, gevonden worden (fig. 11, pag. V). Granulocyten worden nog maar weinig aangetroffen. Het implantaat wordt omgeven door een dunne, vezelrijke bindweefsellaag. Het vezelverloop is georiënteerd evenwijdig aan het implantaatoppervlak. De afstand tussen de spierlagen en het implantaat is veel kleiner geworden dan in de implantaten van 10 dagen. De granulatiewal is verdwenen. In de meeste lacunen wordt geen paarskleurende kernsubstantie meer aangetroffen. Een enkele maal vindt men in het centrum van een dikke bot-

balk nog donker kleurende korrels in de lacunen. Het dode merg is, waar het nog is waar te nemen, rose gekleurd en de kernen nemen geen paarse kleurstof aan.

D.V.-bot *21 dagen* na implantatie (fig. 9, pag. V): het beeld komt overeen met dat na 14 dagen implantatieduur. Het aantal plasmacellen is wat toegenomen.

D.V.-bot *60 dagen* na implantatie: de afmetingen van het implantaat zijn ongeveer dezelfde als in de voorgaande preparaten. De botbalkjes zijn slanker. Plasmacellen en andere rondkernigen worden aangetroffen, maar zijn minder talrijk dan op dag 21. Reuzencellen liggen zowel centraal als perifeer in het implantaat. Het implantaat wordt omgeven door een dunne bindweefsellaag.

D.V.-bot *120 dagen* na implantatie: van de 6 bestudeerde implantaten is in 5 gevallen tenminste $^2/_3$ over. Een keer worden nog slechts enkele korrels beenweefsel aangetroffen. Het beeld is overigens als op 60 dagen na implantatie.

B. De microscopie van de H_2O_2-botimplantaten

H_2O_2-bot *voor de implantatie* (fig. 2, p. III): normaal gevormde, glad begrensde botbalkjes met een homogeen uiterlijk. De ruimten tussen de botbalkjes en de botlacunes zijn leeg. De rand van een enkele lacune kleurt paars; waarschijnlijk doordat resten kernsubstantie zijn achtergebleven.

H_2O_2-bot *2 dagen* na implantatie: de ruimte tussen de balkjes van het implantaat is gevuld met een ijl net van fibrinedraden, waarin verspreid granulocyten liggen. Het gastheerweefsel ligt direct tegen het implantaat aan. Het bestaat uit losmazig bindweefsel, is licht oedemateus en bevat een gering aantal granulocyten. In deze weefsellaag vindt men verder een aantal gezwollen cellen met grote donkere kern en sterk kleurend protoplasma: geprikkelde fibroblasten en histiocyten. Spierlagen, subcutis en huid tonen geen veranderingen.

H_2O_2-bot *4 dagen* na implantatie: het centrum van het implantaat bevat een fibrinenet met enkele granulocyten. In de randen treft men jong bindweefsel, rijk aan capillairen, dat een voortzetting vormt van een dunne laag van dit weefsel die tegen het implantaat aanligt. Hier en daar is tegen een botbalkje een zeer langgerekte veelkernige reuzencel te zien. De omgving van het implantaat toont weer een matig aantal granulocyten.

H_2O_2-bot *7 dagen* na implantatie (fig. 4, pag. III): de ruimten in het

implantaat zijn nu grotendeels gevuld met een los, jong bindweefsel met vele capillairen. Het centrum toont hier en daar nog een gebied met alleen 'n fibrinenet en granulocyten. Op vele plaatsen in het hele implantaat vindt men reuzencellen die langgerekt van vorm zijn en direct tegen de botbalkjes aanliggen. Het weefsel in de omgeving van het implantaat toont meest geen reactie. De spierlaag ligt vaak direct tegen het botweefsel aan. In vele preparaten wordt aan de kant van de huidspier of aan die van de rompspier een meer of minder brede weefselspleet gevonden, bekleed met een samenhangende cellaag en vaak met een wand van meerdere cellagen dik (niet afgebeeld). Soms vindt men in deze spleet een amorphe rose massa. De opbouw van deze holte toont grote overeenkomst met die van een bursa. De „bursawand", die van het implantaat afgekeerd ligt, bestaat meestal uit een vrij dikke laag celrijk jong bindweefsel. Hierdoor kan soms ten onrechte de indruk gewekt worden van walvorming als bij de beschreven D.V.-bot implantaten. Een reactie-wal tussen bursa en implantaat komt echter niet voor.

H_2O_2-bot *10 dagen* na implantatie (fig. 6, p. III): de ruimten tussen de botbalkjes zijn nu geheel ingenomen door jong capillairrijk, collageen bindweefsel. Aan de randen van het implantaat is dit weefsel vrij celarm en bevat de tussenstof meer vezelstructuren. Het weefsel in het implantaat toont nog sporadisch een granulocyt. De vrij talrijke reuzencellen zijn langgerekt van vorm en liggen tegen de botbalkjes aan. Er is geen bindweefselwal om het implantaat heen.

H_2O_2-bot *14 dagen* na implantatie (fig. 8, pag. V): de cellen in het weefsel tussen de botbalkjes zijn meer langgerekt van vorm. De tussenstof bevat veel vezels. Het aantal capillairen is wat afgenomen. Het weefsel maakt een rijpere indruk. Aantal en vorm van de reuzencellen is onveranderd.

H_2O_2-bot *21 dagen* na implantatie (fig. 10, p. V): het algemene aspect is als op dag 14. Drie van de acht preparaten tonen op één plaats infiltratie met rondkernigen waarbij een enkele plasmacel gevonden wordt.

H_2O_2-bot *60 dagen* na implantatie: het totale oppervlak van het implantaat is duidelijk verminderd, tot ongeveer $\frac{1}{2}$ tot $\frac{2}{3}$ van de oorspronkelijke afmetingen. De botbalkjes maken een slankere indruk dan bij de jongere implantaten. De ruimte tussen de balkjes en het gebied vlak om het implantaat wordt ingenomen door een dicht, fibreus bindweefsel, dat hier en daar infiltratie met rondkernigen en enkele plasmacellen toont. Ook vindt men verspreid granulocyten. In het hele implantaat treft men een matig groot aantal reuzencellen, meest in direct contact met de botbalkjes.

H_2O_2-bot *120 dagen* na implantatie: van de 5 implantaten is er in 3 gevallen niets meer te vinden. Van de beide overige resten er nog macroscopisch enkele brokjes. Het microscopische beeld hiervan is als dat op dag 60.

C. Microscopie van de implantaten van autoloog-bot

Autoloog gevroren bot *7 dagen na implantatie:* de ruimte tussen de botbalkjes wordt ingenomen door een jong, vezelarm en capillairrijk bindweefsel. De botlacunes zijn alle leeg. Reuzencellen worden, in matige hoeveelheid, alleen in de periferie van het implantaat aangetroffen. Het gastheerweefsel om het implantaat toont geen reactie, afgezien van een enkele granulocyt.

Autoloog gevroren bot *10 dagen* na implantatie: dit implantaat bevat een corticalislaag. Deze wordt aan één zijde begrensd door spongieus bot. Tegen de corticalis aan ligt dood beenmerg. Verder is de ruimte tussen de botbalkjes overal ingenomen door jong bindweefsel met een wat rijper aspect. Het aantal reuzencellen is kleiner dan bij de H_2O_2-bot implantaten van dag 10. Er is geen walvorming om het implantaat.

Autoloog gevroren bot *14 en 21 dagen* na implantatie: het beeld wijkt practisch niet af van dat van de H_2O_2-bot implantaten. De rondkernigen ontbreken ook hier. In een van de beide implantaten van 21 dagen wordt een heel enkele plasmacel gevonden.

Overzicht der gevonden verschillen

Het blijkt, dat er duidelijke verschillen bestaan in de gastheerreactie op de beide vormen van heteroloog botweefsel.

Na een implantatieduur van 2 en 4 dagen is er bij beide botsoorten nog nauwelijks sprake van reactie.

Op de 7e dag is er in het H_2O_2-bot een vergevorderde ingroei van jong bindweefsel met capillairen, terwijl het gastheerweefsel in de directe omgeving onveranderd is. De reactie op het botweefsel wordt vertegenwoordigd door vorming van reuzencellen, die in de coupes steeds een langgerekte vorm hebben en vlak tegen de botbalkjes aanliggen. Het D.V.-bot implantaat is op de 7e dag nog nauwelijks aangetast. Er zijn wat granulocyten binnengedrongen in de weefselschotten van het dode beenmerg. De weefsellaag direct om het implantaat echter, vertoont een

sterke reactie. Er bestaat hier een brede laag zeer vaatrijk jong bindweefsel, met matige granulocyten-infiltratie. Het hele gebied tussen de spierlagen en het implantaat wordt ingenomen door deze ontstekingswal. Ook hier zien wij veel reuzencellen, daar waar het gastheerweefsel in contact kwam met het botimplantaat. De reuzencellen hebben een meer ronde vorm en tonen voorkeur voor geïsoleerd liggende botscherfjes.

Het beeld van het H_2O_2-bot verandert bij langere duur van de implantatie, tot en met 3 weken, weinig. Er treedt een zekere rijping van het weefsel in de ruimte tussen de botbalkjes op, waardoor een afgrenzing van het implantaatgebied tegenover het omringende losse bindweefsel ontstaat.

Om het D.V.-bot is op de 10e dag de ontstekingswal nog duidelijk. Op de 14e dag is deze wal gereduceerd tot een dunne fibreuze laag. Intussen is het dode mergweefsel van het implantaat vrijwel geheel vervangen door jong bindweefsel, dat rijk is aan capillairen.

Van de 14e dag af vinden wij constant infiltratie van het weefsel van het D.V.-bot implantaat en van de directe omgeving ervan met rondkernigen en plasmacellen, een verschijnsel dat tot op de 21ste dag bij de H_2O_2-bot implantaten vrijwel geheel ontbreekt. Bij een implantatieduur van 60 en 120 dagen is er ook in de H_2O_2-bot implantaten deze cellige infiltratie, zodat in dit opzicht het verschil tussen de beide implantaatsoorten verdwenen is. De resorptie van het H_2O_2-bot is nu veel verder voortgeschreden en na 120 dagen wordt in de meeste gevallen geen H_2O_2-bot implantaat meer gevonden. Ook is er geen littekenweefsel op de plaats waar het implantaat gelegen heeft.

De implantaten van autoloog bot tonen een beeld, dat alleen door een kleiner aantal reuzencellen verschilt van de H_2O_2-bot implantaten. Opmerkelijk is, dat wij bij geen enkel implantaat een aanduiding van botvorming hebben waargenomen.

Samenvatting

Op dag 7 en 10 is het D.V.-bot implantaat omgeven door een wal, bestaande uit granulatieweefsel. Deze wal ontbreekt bij het H_2O_2-bot implantaat geheel.

Tussen dag 10 en 14 verdwijnt deze reactiewal om het D.V.-bot implantaat.

Op dag 14 en 21 is er infiltratie van het D.V.-bot implantaat met plasmacellen en andere rondkernigen. Ook deze reactie ontbreekt in op één na alle gevallen bij de H_2O_2-bot implantaten.

Op dag 60 en 120 blijkt het H_2O_2-bot in veel sterkere mate geresorbeerd te zijn dan het D.V.-bot. Het weefsel om en tussen de botimplantaten vertoont nu in beide botsoorten een matig aantal rondkernigen en plasmacellen.

De gastheercellen blijken zeer gemakkelijk in het H_2O_2-bot binnen te dringen en reuzencelvormig is de enige weefselreactie op de aanwezigheid van het implantaat. Het binnendringen van de gastheercellen in het D.V.-bot vordert langzaam.

Reuzencellen vindt men in de H_2O_2-bot implantaten overal waar gastheerweefsel in contact komt met het implantaat. Deze reuzencellen hebben een langgerekte vorm en liggen tegen de botbalkjes aan. In de D.V.-bot implantaten blijft de reuzencel in hoofdzaak aan de periferie, ligt ook tegen de bottussenstof aan, maar heeft een meer ronde vorm.

Discussie

Weefselpenetratie in het implantaat: gastheerweefsel in de vorm van jong bindweefsel, capillairen en histiocytaire cellen dringt zeer gemakkelijk binnen in het H_2O_2-bot. Dit proces verloopt bij het D.V.-bot veel trager. Men zou geneigd zijn deze vertraging toe te schrijven aan de aanwezigheid van het dode beenmerg dat opgeruimd moet worden, ware het niet, dat het dode beenmerg in de autologe implantaten een veel geringere hinderpaal voor het binnendringen van het gastheerweefsel blijkt te vormen. Dit moeilijke penetreren van gastheerweefsel in de D.V.-bot implantaten berust dus waarschijnlijk op factoren in het implantaat die de migratie van bindweefselcellen van de gastheer remmen.

De veelkernige reuzencellen: deze cellen treden vrijwel uitsluitend op in nauw contact met de botsubstantie. Vaak vindt men deze cellen in resorptie-lacunes van de botsubstantie. Daar de implantaten hier gelijk gesteld mogen worden met, voor de proefdieren, lichaamsvreemde stof menen wij deze cellen vreemdlichaam-reuzencellen te moeten noemen. Hun relatie tot de botsubstantie doet vermoeden, dat zij een werking uitoefenen, die overeenkomt met die van osteoclasten. Er is verschil in hun localisatie en vorm in de beide implantaatsoorten. Deze verschillen lijken ons verklaard te kunnen worden door te veronderstellen, dat zowel het optreden als de vorm van deze cellen bepaald worden door het oppervlak aan naakte en min of meer beschadigde bottussenstof, dat voor de ingroeiende gastheercellen bereikbaar is. Een essentieel verschil tussen de implantaatsoorten, dat samen zou moeten gaan met de aanwezigheid van

bepaalde weefselcomponenten in het D.V.-bot die in het H_2O_2-bot ontbreken, wordt daarom o.i. niet door de localisatie van de reuzencellen zichtbaar gemaakt.

De walreactie: deze reactie wordt uitsluitend gevonden om de D.V.-bot implantaten op dag 7 en 10. De reactie moet opgetreden zijn na de 4e dag en omstreeks de 14e dag weer zijn afgelopen. Daar de reactie zowel om het H_2O_2-bot als om het autologe-bot ontbreekt, hangt zij waarschijnlijk samen met de aanwezigheid van dood heteroloog beenmerg en/of dode botcellen in het D.V.-bot.

De plasmacelinfiltratie: deze wordt in sterke mate aangetroffen in de D.V.-bot implantaten op dag 14 en 21. In de H_2O_2-bot implantaten en die van autoloog-bot vindt men soms sporadisch een plasmacel. Bij langere implantatieduur worden zowel in D.V.-bot als in H_2O_2-bot enkele plasmacellen aangetroffen.

Deze cellen worden algemeen als de dragers en vormers van antilichamen beschouwd. De aanwezigheid van deze cellen in de D.V.-bot implantaten op dag 14 en 21 zou men kunnen opvatten als aanwijzing voor locale antilichaamproduktie tegen een antigeen uit het implantaat. De aanwezigheid van deze cellen in de H_2O_2-bot implantaten op dag 60 en 120 zou erop kunnen berusten, dat er uit het dieper gelegen deel van de tussenstof, dat door het maceratieproces niet bereikt werd, antigeen vrijgekomen is.

Het verschil in tempo van de resorptie van de botsubstantie: deze resorptie blijkt bij het H_2O_2-bot eerder plaats te vinden dan bij het D.V.-bot. Op de 21ste dag na de implantatie is dit verschijnsel nog niet waar te nemen en ziet men in het weefsel, dat tegen de botbalkjes aanligt geen verschil afgezien van de rondcelinfiltratie bij het D.V.-bot. Een verschil in het gastheerweefsel dat tegen de botsubstantie gevormd is, lijkt daarom niet de oorzaak van deze sneller verlopende resorptie. Is dan toch ook de botsubstantie door het maceratieproces veranderd? Men kan hier denken aan verandering in samenstelling of in structuur. Kleuringen van het implantatiemateriaal met PAS-kleuring, toluidineblauw, Azan, volgens van Gieson en met een reticuline-kleuring volgens Gomori, tonen aan dat H_2O_2-bot iets sterker PAS-positief is, maar dat er overigens geen verschillen zijn. Mogelijk heeft de bewerking met het sterk oxyderende H_2O_2 meer aldehydgroepen beschikbaar gemaakt.

Onderzoek van de collagene vezels met gepolariseerd licht toonde aan,

dat deze vezels in het H_2O_2-bot normaal aanwezig zijn. Ook bij fractionering van het licht in de verschillende spectrumkleuren kon geen verschil tussen collageen in H_2O_2-bot en D.V.-bot worden aangetoond.

Het komt ons daarom niet waarschijnlijk voor, dat de samenstellende elementen van de beide botsoorten verschillen. Ook lijken er geen belangrijke verschillen in quantitatief opzicht tussen het voorkomen van deze elementen in de beide botsoorten te bestaan. Een structuurverandering door de maceratie, die sneller verloop van de resorptie veroorzaakt, blijft mogelijk.

Kenmerkend voor het verschil in de reactie gedurende de eerste 21 dagen na de implantatie van D.V.-bot en H_2O_2-bot is:

1. walvorming om het D.V.-bot implantaat op dag 7 en 10.
2. voorkomen van talrijke plasmacellen in het D.V.-bot implantaat op dag 14 en 21.
3. trager binnendringen van het gastheerweefsel in het D.V.-bot.

De kenmerken van de D.V.-botreactie, die het best waargenomen kunnen worden, zijn de walreactie en de plasmacellen.

Het D.V.-bot bevat in de ruimte tussen de botbalkjes een vetmerg. Daarom onderscheiden wij drie weefselcomponenten in deze implantaatsoort:

1. de botsubstantie, 2. het vetweefsel, 3. de cellulaire beenmergelementen en osteocyten. De botsubstantie in het D.V.-bot kan ons inziens gelijkgesteld worden aan die in het H_2O_2-bot, dus zijn de typische D.V.-botreacties blijkbaar gebonden aan de componenten 2 en/of 3. Zij ontbreken wanneer alleen de elementen van de bottussenstof in de vorm van H_2O_2-bot worden aangeboden.

De vraag naar de betekenis van deze beide weefselcomponenten, de componenten 2 en 3, voor de kenmerkende reacties bij de D.V.-botimplantaten wordt in het volgende hoofdstuk behandeld. Anders geformuleerd luidt deze vraag: welke component van het D.V.-bot veroorzaakt de walreactie en welke de plasmacelreactie?

Conclusie

De histologische reactie van de cavia op D.V.-kalfsbot verschilt duidelijk en constant van de reactie op H_2O_2-kalfsbot, afkomstig van één kalf.

De reactie op het D.V.-bot wordt gekenmerkt door het optreden van een ontstekingswal om het implantaat op dag 7 en 10 na het inbrengen ervan, en door talrijke plasmacellen op dag 14 en 21 na de implantatie. Deze beide verschijnselen ontbreken bij de H_2O_2-bot implantaten.

Daar het histologisch onderscheid tussen D.V.-bot en H_2O_2-bot bestaat in de aanwezigheid van geconserveerd dood celmateriaal in het D.V.-bot (osteocyten, beenmergcellen en vetcellen) terwijl de botsubstantie voor beide botsoorten gelijk is, kan de vraag gesteld worden:

Is het optreden van beide reacties gecorreleerd met de aanwezigheid van een der genoemde componenten of worden ze elk door een andere component veroorzaakt?

HOOFDSTUK III

ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE VERSCHILLENDE COMPONENTEN VAN HET GECONSERVEERDE HETEROLOGE BOTIMPLANTAAT

In dit hoofdstuk wordt de vraag behandeld: Welke componenten van het D.V.-botimplantaat veroorzaken de kenmerkende histologische reacties op dit implantaat?

De drie componenten, die wij in het D.V.-bot onderscheiden zijn botsubstantie, vetweefsel en cellulaire elementen van bot en beenmerg. De botsubstantie in het D.V.-bot menen wij, wat de samenstelling betreft, gelijk te mogen stellen aan die van het H_2O_2-bot. De invloed van deze component op de weefselreactie is dus in hoofdstuk II onderzocht.

In het hier volgende hoofdstuk zal nu eerst de invloed van kalfsvetweefsel en kalfsvet behandeld worden en vervolgens de weefselreactie op celrijk kalfsweefsel worden nagegaan met behulp van kalfsthymusimplantaten. Het bleek vrij gemakkelijk uit kalfsthymusweefsel zeer celrijke en practisch vetvrije implantaten te isoleren. Bovendien is dit weefsel gemakkelijk in ruime mate te verkrijgen en daardoor ook geschikt als grondstof voor weefselextracten, die bij het immunologische deel van het onderzoek nodig zullen zijn. Het bleek daarentegen zeer bezwaarlijk een vetvrij beenmerg te bereiden zonder daarbij de eiwitten in dit merg te veranderen. Hierdoor kwam vetvrij beenmerg als grondstof voor een antigeen bevattend weefselextract niet in aanmerking.

Achtereenvolgens zal de reactie beschreven worden op ontvet D.V.-bot, kalfsvetweefsel, H_2O_2-bot gedrenkt in kalfsvet, kalfsvet gezuiverd van weefselelementen, kalfsthymusweefsel en H_2O_2-bot waarvan de ruimten tussen de botbalkjes gevuld zijn met kalfsthymusweefsel. Dit onderzoek valt in 2 onderdelen uiteen:

A. de invloed van kalfsvet en kalfsvetweefsel.
B. de invloed van kalfscellen.

A. De invloed van het kalfsvet en het kalfsvetweefsel

De volgende experimenten werden verricht om de invloed van vet en vetweefsel te onderzoeken.

Proef 1: Implantatie van ontvet D.V.-bot

Materiaal en techniek: voor het bereiden van de implantaten is de vries-substitutie-methode gevolgd, waarbij gebruik gemaakt werd van het apparaat, beschreven door van Duyn en Oort (1962). De gevolgde methode wordt in het aanhangsel beschreven op pagina 1. Histologisch waren de implantaten bij kleuring met Soedan III vetloos. In totaal waren na de eerste geslaagde bewerking 5 implantaten beschikbaar. Er werden 3 proefdieren gebruikt, waarvan er 2 aan de ene kant 2 ontvette en aan de andere kant 2 normale D.V.-botimplantaten kregen. De derde cavia kreeg 1 ontvet en 1 normaal D.V.-botimplantaat. Bij de eerste 2 cavia's werd op dag 7 en 10 telkens 1 implantaat van elke soort uitgenomen. Bij de derde cavia geschiedde dit op dag 4. Implanteren en uitnemen geschiedde als beschreven op blz. 13 en 14. Deze proef leverde dus 1 implantaat na 4 dagen en telkens 2 implantaten na 7 en 10 dagen proefduur. Voor ieder ontvet implantaat is er een controle D.V.-botimplantaat, afkomstig uit dezelfde gastheer.

Histologie van de implantaten: de gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel 2 op blz. 5 van het aanhangsel.

De niet ontvette D.V.-bot implantaten toonden het beeld overeenkomend met de implantatieduur, zoals beschreven in het vorige hoofdstuk. De gastheerreactie bleek dus niet afwijkend te zijn.

Het beeld van de ontvette implantaten was als volgt.

Na *4 dagen* zijn granulocyten in de oppervlakkige lagen van het implantaat binnengedrongen, voornamelijk in de met een fibrinenet gevulde holten van de „vetcellen". Op sommige plaatsen reikt dit binnendringen tot op ⅔ van het centrum van het implantaat. Reuzencellen worden nog niet aangetroffen. De weefselreactie om het implantaat is als bij het D.V.-bot van 4 dagen.

Na *7 dagen* zijn granulocyten overal tot in het centrum van het implantaat doorgedrongen en liggen weer vooral in de holten van de „vetcellen". Aan de randen van het implantaat dringt jong vaatrijk bindweefsel met histiocytaire cellen binnen. Dit weefsel is dieper gekomen dan in het

D.V.-bot implantaat bij gelijke implantatieduur en vult ook de vetcelholten (fig. 12, pag. V). Er is een ontstekingswal gevormd, die geheel vergelijkbaar is met die om het D.V.-bot van 7 dagen (fig. 18, pag. VII). Aan de periferie van het implantaat liggen reuzencellen tegen het botweefsel aan.

Na *10 dagen* heeft de weefselingroei hetzelfde karakter als in het vorige stadium, maar is dieper gekomen. Er is weer geen sprake van „sparen" van de vetcellen. De ontstekingsreactie om het implantaat is geheel vergelijkbaar met die om het D.V.-bot. In een van de beide implantaten wordt sporadisch een plasmacel gevonden. Aantal en localisatie van de reuzencellen zijn vergelijkbaar met die bij het D.V.-bot.

Samenvatting: de ontstekingswalreactie is bij de ontvette implantaten als bij het onbewerkte D.V.-bot. Het gastheerweefsel dringt gelijkmatiger en iets gemakkelijker in het ontvette bot door. De overeenkomst tussen de reacties op beide implantaatsoorten op dag 4, 7 en 10 is opvallend.

Proef 2: Implantatie van kalfsvetweefsel

Materiaal en techniek: het vetweefsel is afkomstig uit het vetlichaam van het kniegewricht en werd verkregen bij een steriele slachting voor de beenbank te Amsterdam. Conservering geschiedde in de vrieskast bij —20° C. Het vetweefsel, dat 6 weken bij deze temperatuur werd bewaard, werd op de dag van implantatie ontdooid en verdeeld in stukjes die ongeveer dezelfde afmetingen hadden als de botimplantaten.

Bij 2 cavia's werden op de op blz. 13 beschreven manier per dier 5 implantaten ingebracht. Bij elk dier is op dag 4, 7, 10, 15 en 21 telkens 1 implantaat weggenomen. Op de 21ste dag was 1 implantaat niet meer te vinden. Een van de preparaten van dag 10 bleek het implantaat niet te bevatten.

Histologie van de implantaten: de gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel 3 op blz. 6 van het aanhangsel.

Na *4 dagen* is er in de weefsellaag tussen spier en vetweefsel een geringe infiltratie met granulocyten en mononucleaire cellen. Op sommige plaatsen is de rand van het implantaat dicht geïnfiltreerd met granulocyten.

Na *7 dagen* (fig. 14, pag. VII) toont het weefsel om het implantaat een dunne granulatiewal vlak tegen het vetweefselstukje aan. De granulo-

cytenpenetratie in het implantaat is wat verder voortgeschreden, waarbij de vetcellen in het algemeen vrij blijven zoals vroeger voor het D.V.-bot beschreven is. Aan de randen is in het implantaat jong bindweefsel waar te nemen, dat vele schuimcellen bevat: lipophagen.

Na *10 dagen* is de reactie om het implantaat nog steeds zeer gering, hoewel er wat meer perivasculaire granulocyteninfiltratie wordt gezien met wat stuwing. De weefselpenetratie in het implantaat is wat verder gevorderd.

Na *15 dagen* vindt men in de randgebieden van het implantaat „vetmeren": grotere, glad begrensde, niet gekleurde gebieden omgeven door een celrijk jong bindweefsel, dat vele schuimcellen bevat. Hier worden ook reuzenschuimcellen gevonden. Het gastheerweefsel is wat verder doorgedrongen naar het centrum van het implantaat, maar overigens is het beeld onveranderd. In een van de twee implantaten worden enkele plasmacellen gevonden.

Na *21 dagen* ligt de rest van het implantaat midden in een gebied van dicht capillairrijk bindweefsel dat in de randgebieden nog een aantal „vetmeren" bevat. Perifeer in het implantaat vindt men vrij talrijke plasmacellen.

Samenvatting: ontstekingswalreactie om het kalfsvetweefselimplantaat op dag 7 en 10 is òf geheel afwezig òf zeer gering. Plasmacellen worden op dag 15 heel sporadisch gevonden. Op dag 21 zijn er meer plasmacellen, maar hun aantal is hier veel geringer dan in de D.V.-bot implantaten. Het binnendringende gastheerweefsel volgt de weefselschotten tussen de vetcellen. Deze cellen blijven lang intact. Eerst op dag 15 wordt samenvloeien van het vet gezien.

Proef **3:** Implantatie van in kalfsvet gedrenkt H_2O_2-bot

Materiaal en techniek: de implantaten werden bereid door steriel fijn geknipt kalfsvet en H_2O_2-bot schijfjes, bij kamertemperatuur, met aether te schudden en daarna de aether te laten verdampen. De botschijfjes waren dan geheel met vet doordrenkt. Enkele tegen de implantaten aangeplakte weefselresten konden gemakkelijk verwijderd worden. Hoewel in een microscopisch preparaat van een dergelijk botschijfje geen cellen of celresten gezien werden, moet het mogelijk geacht worden, dat toch eiwitcomponenten in oplossing gegaan zijn en zo mee verplant werden.

Bij 2 cavia's werden per dier 5 implantaten ingebracht. Uit elk dier werd op de 4e, 7e, 10e, 14e en 21e dag telkens één implantaat weggenomen.

Histologie van de implantaten: de gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel 4 op blz. 6 van het aanhangsel. Bij het onderzoek van de preparaten bleek een groot aantal botlacunes van H_2O_2-bot osteocytresten te bevatten. De maceratie is dus minder volledig geweest als bij de vroeger gebruikte implantaten.

Na *4 dagen* vindt men in en vlak om het implantaat wat fibrinedraden en granulocyten tussen optisch lege, maar scherp begrensde, ronde of ovale holten, die wij voor vetdruppels houden. Het gastheerweefsel vlak tegen het implantaat aan vertoont geen afwijkingen.

Na *7 dagen* is het gastheerweefsel, in de vorm van een vaatrijk bindweefsel dat vele schuimcellen bevat, reeds vrij ver in het implantaat doorgedrongen. In de periferie van het implantaat zijn er in dit gastheerweefsel holten te zien als in de preparaten van 4 dagen. Deze holten zijn echter veel groter. Het lijken samengevloeide vetdruppels. De walvorming om het implantaat is vergelijkbaar met die bij de H_2O_2-bot implantaten.

Na *10 dagen* is het implantaat geheel doorgroeid met celrijk en capillairrijk weefsel, waarin steeds talrijke schuimcellen en ook schuimreuzencellen voorkomen. „Vetmeren" blijven steeds aanwezig. Reuzencellen zijn matig talrijk en hebben de langgerekte vorm, die men bij H_2O_2-bot implantaten ziet. In een van de vier beschikbare preparaten wordt sporadisch een plasmacel gevonden. Ook nu is de walvorming gering (fig. 16, blz. VII).

Na *14 dagen* zijn ingroei en type van ingroeiend weefsel onveranderd. Drie van de vier beschikbare preparaten bevatten enkele plasmacellen. Geen walvorming.

Na *21 dagen* is het beeld van implantaat en omgeving als na 14 dagen. Alle implantaten bevatten plasmacellen. De dichtheid van de cellen is geringer dan bij de D.V.-bot implantaten werd aangetroffen.

Samenvatting: er komt om deze implantaatsoort geen vorming van een wal van ontstekingsweefsel voor. Plasmacellen worden in de implantaten van 10 en 14 dagen sporadisch gevonden, en zij zijn na 21 dagen steeds aanwezig. Hun aantal is kleiner dan bij de D.V.-bot implantaten gevonden werd.

Proef 4: Implantatie van gezuiverd kalfsvet

Materiaal en techniek: om de invloed van een eventuele bijmenging van celmateriaal bij het vet te onderzoeken werd een celvrij vetextract vervaardigd. Hiertoe werd kalfsvetweefsel met aether fijngemalen en door en grove zeef gefiltreerd. Het filtraat werd drie uur geschud en opnieuw gefiltreerd. Vervolgens werd dit filtraat door een steriele Seitzfilter getrokken en steriel opgevangen. De aetherdamp werd in de exsiccator afgezogen. (Bereidingsmethode, zie aanhangsel pag. 1).

Het geëxtraheerde vet werd ingebracht bij 2 cavia's elk op 4 plaatsen. Omdat het vet niet vast werd, moest de operatiemethode een weinig gewijzigd worden. Rechts en links van de mediaanlijn werden 2 kleine incisies gemaakt. Vanuit elke incisie werd stomp een zakje gevormd in de weefsellaag onder de huidspier en gericht naar lateraal. In elk zakje werd ongeveer een halve cc vet gedaan. Het vet werd direct dun vloeibaar bij de lichaamstemperatuur van de cavia, maar door optillen van de wondranden, direct sluiten met een agrafe en afdekken van de wond met collodion kon wegvloeien van het vet worden verhinderd.

De plaats van implantatie werd en bloc, met de oppervlakkige laag van de rompspieren, geëxtirpeerd op dag 7, 10, 14 en 21, waarbij telkens van elk dier één implantaat genomen werd.

Histologie: de preparaten tonen op de 7e dag in het implantatiegebied ongekleurde, goed begrensde, ronde tot ovale gebieden, waaromheen een dunne laag granulatieweefsel ligt. In dit granulatieweefsel komen vrij talrijke schuimcellen voor. Wij hebben deze lege plekken weer geïnterpreteerd als vetophopingen. Bij langere duur van de implantatie vindt men een celrijk en capillairrijk gebied, dat niet direct tegen de spierlagen aanligt. Hierin komen steeds talrijke schuimcellen voor. Op dag 7 wordt in één implantaat een enkele plasmacel gevonden, op dag 10 vinden wij in beide implantaten enkele plasmacellen, op dag 14 weer in beide enkele en op dag 21 geen.

Samenvatting: ook bij deze proef blijkt plasmacelinfiltratie voor te komen, zij het in heel geringe mate. De plasmacellen treden hier eerder op dan bij D.V.-bot implantaten.

Zowel na implantatie van kalfsvetweefsel als van H_2O_2-bot gedrenkt in kalfsvet en van gezuiverd kalfsvet vinden wij plasmacellen, soms zelfs

reeds op de 7e dag, terwijl de weefselreactie tegen de rand van de implantaten zeer grote overeenkomst toont met die bij de H_2O_2-bot implantaten. Het is mogelijk dat deze proefdieren afwijkend reageerden. Om dit na te gaan werd proef 5 verricht.

Proef **5:** implantatie van H_2O_2-bot en in kalfsvet gedrenkt H_2O_2-bot bij hetzelfde proefdier.

Materiaal en techniek: de in kalfsvet gedrenkte H_2O_2-bot implantaten werden bereid als beschreven op blz. 32. Bij 2 cavia's werden aan de rechterzijde twee schijfjes H_2O_2-bot en aan de linkerzijde 2 schijfjes in vet gedrenkt H_2O_2-bot ingebracht. Na 14 en 21 dagen werd telkens van beide soorten implantaten een exemplaar verwijderd.

Histologie: in de H_2O_2-bot implantaten werden geen plasmacellen gevonden. De in vet gedrenkte implantaten tonen bij het ene dier op dag 14 en 21 enkele plasmacellen bij het andere dier op dag 14 een wat sterkere plasmacelinfiltratie en op dag 21 een heel enkele plasmacel.

Samenvatting: in hetzelfde proefdier treedt binnen 3 weken in het H_2O_2-bot met kalfsvet geregeld en in het H_2O_2-bot alleen zelden plasmacelinfiltratie op.

B. De invloed van de cellen

De volgende proeven werden verricht om de invloed van heteroloog celmateriaal na te gaan.

Proef **6:** Implantatie van kalfsthymusweefsel

Materiaal en techniek: het thymusweefsel voor deze proeven is direct na de slachting verkregen en binnen een uur na de dood van het dier in de vrieskast geplaatst bij — 20° C. Voor het vervaardigen van de implantaten werd een gaaf stuk thymus ontdooid, het oppervlak ervan door uitgloeien gesteriliseerd en daarna weefsel genomen uit het centrum van het weefselstuk. Van het zo gewonnen weefsel werd een gedeelte bacte-

riologisch onderzocht. Dit bleek steriel. Microscopisch was de structuur die van normaal thymusweefsel.

Bij 2 cavia's werden op 5 plaatsen stukjes van dit thymusweefsel van naar schatting gelijk volume ingebracht. De implantatieplaatsen werden na 4, 7, 14 en 18 dagen geëxtirpeerd. Op de 18e dag stierven beide dieren tengevolge van een stalepidemie.

Wij moeten er rekening mee houden, dat deze dieren mogelijk al langer ziek waren en dat hierdoor de weefselreactie beïnvloed kan zijn. Wanneer men samenhang veronderstelt tussen sensibilisatie van de proefdieren en de hier bestudeerde weefselreacties, dan kan men bij ziekte van het proefdier misschien een zwakkere reactie verwachten, omdat de anti-lichaamsproductie gestoord is. Bestudering van de thymus-implantaten uit de proeven beschreven in hoofdstuk 4 gaven echter geen steun aan deze veronderstelling. (Bestudeerd werden 2 implantaten van de zevende dag, 4 van de 10e dag, 5 van de 14e dag, en 3 van de 21e dag na de implantatie).

Histologie: de gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel 5 op blz. 7 van het aanhangsel.

na *4 dagen* vindt men om de implantaten een dunne laag fibrine met granulocyten en enkele histiocyten.

na *7 en 10 dagen* (fig. 13 en 15, pag. VII) wordt de weefsellaag tussen implantaat en spierlagen ingenomen door een proliferatief weefsel, dat rijk is aan capillairen en histiocytaire cellen en dat matig veel granulocyten bevat.

na *14 dagen* is de grens van het implantaat niet zeker meer te bepalen. Centraal vindt men nog onveranderd thymusweefsel. Dit wordt omgeven door een dikke laag granulatieweefsel, dat vooral naar centraal toe veel granulocyten bevat. Om dit granulatieweefsel ligt een dun laagje vezelrijk en celarm bindweefsel, dat het hele gebied omgeeft. Hierbuiten vindt men het vrijwel onveranderde weefsel van de laag waarin geïmplanteerd werd. Het implantaat bevat vele plasmacellen.

na *18 dagen* is het centrum van het thymusweefsel beide keren uitgevallen en vindt men een granulatiewal omgeven door een dunne fibreuze bindweefselkapsel. In beide implantaten worden weer talrijke plasmacellen aangetroffen.

Samenvatting: op de vierde dag komt het beeld van de weefselreactie om het implantaat overeen met dat bij D.V.-bot en H_2O_2-bot. Op de 7e en 10e dag is de grens van implantaat en gastheerweefsel goed te her-

kennen en vindt men in het gastheerweefsel een ontstekingswal zoals bij D.V.-bot implantaten. Plasmacellen komen dan niet voor. Op de 14e en 18e dag is de implantaatgrens niet zeker meer waar te nemen en het is daardoor niet mogelijk de weefselpenetratie in de implantaten met zekerheid te onderscheiden van de walreactie er omheen. In de tabel worden daarom walreactie en penetratie niet vermeld. Infiltratie met plasmacellen is nu steeds aanwezig.

Proef **7:** Implantatie van H_2O_2-bot met thymusweefsel.

Materiaal en techniek: de implantaten werden vervaardigd door steriel thymusweefsel met een spatel in de H_2O_2-bot pastilles te drukken. Microscopisch onderzoek toont aan, dat het op deze wijze gelukte de ruimte tussen de botbalkjes vrij gelijkmatig te vullen met thymusweefsel.

Bij 2 cavia's werden per dier 5 van deze pastilles ingeplant. Bij elk dier werd na 4, 7, 10, 14 en 21 dagen één implantaat weggenomen. Daar een cavia op de 18e dag stierf zijn er tenslotte 2 implantaten van dag 4, 7, 10 en 14, en van dag 18 en 21 ieder één implantaat beschikbaar.

Histologie: de gegevens van alle onderzochte preparaten vindt men in tabel 6 op blz. 7 van het aanhangsel.

na *4 dagen* is er direct om het implantaat een dunne laag fibrine met granulocyten en histiocytaire cellen. Waar de ruimte tussen de beenbalkjes niet gevuld is met thymusweefsel vindt men door het hele stuk enkele granulocyten en wat fibrine.

na *7 dagen* is het implantaat omgeven door een dikke granulatiewal met vele capillairen, fibroblasten en histiocyten, maar wenig granulocyten. De wal reikt in het algemeen tot aan de spierlagen en is daar waar de vulling van het implantaat het best gelukt was, ook het dikst. Het granulatieweefsel dringt ook in het implantaat binnen, maar blijft ver van het centrum. Aan de periferie worden enkele reuzencellen gevonden.

na *10 dagen* is de reactiewal nog dik, maar toont nu organisatie met vezelverloop evenwijdig aan het implantaatoppervlak. Het gastheerweefsel bereikt op een enkele plaats het centrum van het implantaat. Een der beide preparaten bevat een enkele plasmacel.

Aan de periferie van het botstukje vindt men vele reuzencellen, langgerekt van vorm en liggend tegen de botbalkjes. (Fig. 17, blz. VII).

na *14 dagen* is het botstukje omgeven door een dunne bindweefselkapsel. Het is vrijwel geheel doorgroeid. Plasmacelinfiltratie is in beide preparaten duidelijk. De reuzencellen liggen in hoofdzaak perifeer.

na *21 dagen* vinden wij hetzelfde beeld met een dunne fibreuze kapsel, een goed doorgroeid implantaat en plasmacelinfiltratie. Het aantal plasmacellen is in vergelijking met de preparaten van 14 dagen niet sterk toegenomen.

Samenvatting: de penetratie van het gastheerweefsel is op dag 10 reeds ver gevorderd.

De reactie om het implantaat is op dag 4 nog gering. Op dag 7 en 10 is het implantaat omgeven door een dikke wal granulatieweefsel, dat op dag 10 enige rijping vertoont. Op dag 14 vindt men een dunne fibreuze bindweefsellaag om het implantaat. Reuzencellen worden steeds overwegend in de periferie van het implantaat gevonden. Plasmacelinfiltratie is op dag 14 en 21 in sterke mate aanwezig. De weefselreactie om implantaten van H_2O_2-bot gecombineerd met thymusweefsel, vertoont de typische kenmerken van die om D.V.-botimplantaten.

Samenvatting van de resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven proeven.

De walreactie. Na implantatie van kalfsvetweefsel, van geëxtraheerd gezuiverd vet, en van met vet doordrenkt H_2O_2-bot is de vorming van een ontstekingswal om het implantaat gering.

Zijn er geconserveerde kalfscellen aanwezig, zoals in het ontvette D.V.-bot, het thymusimplantaat en het H_2O_2-bot gevuld met thymusweefsel, dan vindt men steeds op dag 7 en 10 een duidelijke walreactie. Het vóórkomen van deze wal is dus gecorreleerd met de aanwezigheid van kalfscellen en niet met die van kalfsvet.

De penetratie van gastheerweefsel in de implantaten. Deze blijkt bij ontvet D.V.-bot sneller te vorderen dan bij D.V.-bot en in de ruimten waar het vet aanwezig geweest is, treft men dan ook gastheercellen aan. Bij het ingroeien van gastheerweefsel in geconserveerd vetweefsel blijven de meeste vetcellen onaangetast. De indruk wordt gewekt, dat de geconserveerde heterologe vetcellen moeilijker worden aangetast dan het beenmerg en dat zij het ingroeien van het gastheerweefsel belemmeren.

Het voorkomen van plasmacellen in de implantaten. In de implantaten van kalfsvetweefsel zijn deze cellen op dag 4 sporadisch, op dag 21 talrijker aanwezig. De „vette" H_2O_2-botimplantaten tonen hetzelfde beeld. Bij implantatie van gezuiverd kalfsvet vonden wij

op dag 7 sporadisch een plasmacel. Op dag 10 en 14 waren er steeds enkele plasmacellen aanwezig en op dag 21 ontbrak deze celsoort weer geheel. Het kalfsvetweefsel bevatte uiteraard naast het vet ook celmateriaal, zodat een sensibiliserende verwacht kan worden. De uitkomsten van proef 5 maken het niet waarschijnlijk, dat het optreden van de plasmacellen bij implantatie van gezuiverd vet toegeschreven kan worden aan abnormaal reageren van de proefdieren. Wij menen te moeten veronderstellen, dat bij de gevolgde methode van zuivering van het vet antigeen werkzame celbestanddelen er in zijn achtergebleven.

Conclusies uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten:

1. Het is zeer waarschijnlijk, dat de vorming van een granulatiewal om de implantaten samenhangt met de aanwezigheid van cellen in de implantaten.
2. Er zijn geen argumenten gevonden voor het toeschrijven van deze walvorming aan de invloed van heteroloog vet.
3. Een plasmacelreactie van een graad als bij het D.V.-bot gevonden wordt treedt alleen op, wanneer cellen in de implantaten aanwezig zijn. Dan treedt de reactie ook op hetzelfde tijdstip op als bij een D.V.-bot implantaat.
4. De zwakke plasmacelreactie bij implantaten van gezuiverd vet bleef onverklaard. Mogelijk moet bij-menging van antigeen werkende weefselbestanddelen bij het gebruikte vet als verklaring worden aanvaard.
5. Het binnendringen van het gastheerweefsel in de implantaten wordt door de aanwezigheid van geconserveerd heteroloog vet gehinderd.

Uit de uitkomsten van de experimenten, die in hoofdstuk II en III beschreven zijn, volgt dat beide histologische reacties van het gastheerweefsel op het D.V.-bot, dus zowel de walvorming óm het implantaat als de sterke plasmacelinfiltratie ván het implantaat, samen gaan met het voorkomen van heterologe kalfsweefselcellenin dit D.V.-bot.

Daar het waarschijnlijk is, dat de transplantatie-antigenen gebonden zijn aan de cellen, is het aanlokkelijk te veronderstellen, dat beide weefselreacties, direct of indirect, veroorzaakt worden door antigenen in de dode kalfscellen uit de implantaten. Mocht aangetoond kunnen worden dat de D.V.-bot dragende cavia's gesensibiliseerd zijn tegen antigeen uit kalfscellen en de dieren waarbij H_2O_2-bot geïmplanteerd is niet, dan zal deze veronderstelling zeer aannemelijk zijn geworden.

HOOFDSTUK IV

DE SENSIBILISERENDE WERKING VAN HETEROLOOG DOOD BOTWEEFSEL

De vraagstelling van het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek luidt: Zijn de constante en duidelijke verschillen in locale weefselreactie op implantatie van heteroloog D.V.-bot en heteroloog H_2O_2-bot te correleren met antigene werking van bepaalde stoffen in het geconserveerde bot en met het ontbreken daarvan in het H_2O_2-bot, welke werking aangetoond zou kunnen worden door het optreden van antilichamen in het eerste geval en het ontbreken er van in het tweede geval?

Wij onderzochten of de proefdieren antilichamen tegen stoffen uit de heterologe botimplantaten vormden, met behulp van de huidanaphylaxiereacties, beschreven door Ovary (1958). Deze huidanaphylaxie berust op een vluchtige vaatreactie met lekkage, die optreedt wanneer antigeen in de huid reageert met, vermoedelijk celgebonden, antilichaam. Zorgt men ervoor dat het bloed van het proefdier tijdens het optreden van de reactie een kleurstof bevat, die de normale vaatwand niet passeert, dan ontstaat er bij positieve reactie een kleurvlek in de huid. De afmeting van de vlek is een maat voor de sterkte van de reactie en maakt quantitatieve beoordeling mogelijk.

Deze testmethode biedt de volgende voordelen:

1. zeer kleine hoeveelheden antilichamen kunnen ermee worden aangetoond. In een systeem met kippenei-albumine als antigeen, kon Ovary een hoeveelheid overeenkomend met 0.003 microgram antilichaamstikstof aantonen.
2. overmaat antigeen stoort de reactie niet.
3. zowel praecipiterende als niet praecipiterende antilichamen worden ermee aangetoond.
4. de methode is beter quantitatief te beoordelen dan de algemene anaphylaxie.

De huidanaphylaxie-reactie kan op twee manieren opgewekt worden.

a. *de actieve huidanaphylaxie* - A.C.A. (Active Cutaneous Anaphylaxis). Men dient een cavia parenteraal antigeen toe. Na verloop van tijd zal dit dier antilichaam tegen het antigeen gevormd hebben en dus actief gesensibiliseerd zijn. Spuit men dan intracutaan een oplossing van het gebruikte antigeen in, nadat de kleurstofoplossing intraveneus is toegediend, dan vindt de antigeen-antilichaam ontmoeting in de huid plaats en treedt een gekleurde vlek op. Test men een aantal zo gesensibiliseerde dieren met een constante antigeendosis, dan is de doorsnede van de kleurvlek een maat voor de sensibilisatiegraad der dieren.

Dit verschijnsel is bruikbaar als testmethode om na te gaan of een cavia antilichaam tegen een bepaald antigeen gevormd heeft. In ons geval gingen wij na of de cavia's na implantatie van D.V.-kalfsbot of H_2O_2-kalfsbot antilichaam gevormd hadden tegen antigenen uit kalfscellen. Als antigeen gebruikten wij een waterig extract van kalfsthymusweefsel. Men moet bij deze testmethoden steeds ter controle ook dieren die niet met implantaat behandeld zijn op dezelfde manier testen, omdat de antigeenoplossing stoffen kan bevatten, die zelf vaatlekkage veroorzaken.

b. *de passieve huidanaphylaxie* - P.C.A. (Passive Cutaneous Anaphylaxis). Door intracutaan inspuiten van antilichaam bevattend serum wordt de huid locaal passief gesensibiliseerd, waarbij het antilichaam aan de cellen gebonden wordt. Tenminste 3 uur later dient men de cavia intraveneus antigeen dat bij het gebruikte antilichaam past toe, samen met een kleurstofoplossing. In het huidgebied, dat door het antilichaam gesensibiliseerd werd, treedt een kleurvlek op.

Dit verschijnsel is ook te gebruiken als test om na te gaan of serum van een gesensibiliseerd dier antilichaam tegen een bepaald antigeen bevat. De sterkte van de reactie is bruikbaar als maat voor de hoeveelheid toegediend antilichaam. In deze test kan men een aantal sera tegelijk beproeven, waardoor het mogelijk is de sensibilisatiegraad van een aantal gesensibiliseerde proefdieren te vergelijken, of de sensibilisatiegraad van één dier op een aantal tijden na inbrengen van de sensibiliserende stof na te gaan. Men gebruikt bij voorkeur witte cavia's van $\pm$ 250 gram.

Wij gebruikten de P.C.A.-test om het antilichaamgehalte in het serum van cavia's op 7, 10, 14 en 21 dagen na implantatie van D.V.-kalfsbot of H_2O_2-kalfsbot te onderzoeken en te vergelijken. Het gebruikte antigeen was weer een waterig extract van kalfsthymusweefsel. Ook in deze proef kunnen stoffen in het testserum die zelf een vaatreactie verwekken soms een vals positieve reactie geven. Volgens Ovary kan men deze

mogelijkheid uitsluiten door óf het serum 50 maal of meer te verdunnen met physiologisch zout, óf de tijd tussen seruminjectie en provocatie te verlengen tot tenminste 6 uur. De tweede methode verdient de voorkeur, wanneer men een laag antigeengehalte in het onderzochte serum vermoedt.

De A.C.A. en de P.C.A.-reactie worden door Ovary afgelezen na 10 minuten. De sterkte van de reactie beoordeelt men naar de middellijn van de kleurvlek, gemeten in millimeters. Een vlek met een diameter van minder dan 5 millimeter noemt Ovary negatief. In onze proeven veroorzaakten de injecties met physiologisch zout een aantal malen kleurvlekken met een afmeting van 5 mm, een heel enkele maal een grotere afmeting. Een kleurvlek tot 6 mm kan dus zeker veroorzaakt zijn door weefselbeschadiging tengevolge van de injectie.

Als proefdier voor deze reacties is de cavia het meest geschikt, omdat een nog zeer duidelijke reactie met een kleinere hoeveelheid antilichaam kan worden opgewekt dan bij de andere diersoorten, waarbij deze test mogelijk is, n.l. rat en muis.

Bij het gebruiken van deze test brachten wij enkele wijzigingen aan.

Het *aflezen van de reactie* bleek goed uitwendig te kunnen worden gedaan, wanneer de huid tevoren voorzichtig mechanisch en chemisch ontharrd was. Chemisch ontharen geschiedde met behulp van het scheerpoeder „Pulvex" in de handel gebracht door N.V. Algin, veterinair pharmaceutische produkten, Den Haag. Storing van de reactie door chemisch ontharen, waar Ovary van spreekt, werd niet waargenomen, immers de injectie met physiologisch zout gaf vrijwel nooit een kleurvlek met diameter groter dan 5 mm (zie de tabellen op blz. 12 t/m 22 van het aanhangsel). Bij dit uitwendig aflezen bepaalden wij de afmeting van de kleurvlek met behulp van een plaatje, bestaande uit hard doorzichtig plastic, waarin ronde openingen zijn aangebracht. De diameter van de openingen klimt van 5 tot 12 mm op met 1 mm en van 12 tot 20 mm tot 2 mm. Elke vlek werd steeds door 2 onderzoekers afgelezen. Het verschil tussen deze beide waarnemingen bedroeg ten hoogste 1 waarde.

Het *tijdstip van aflezen* moest bij de A.C.A.-test verlegd worden naar 30 minuten na de provocerende injectie, omdat pas na dit tijdsverloop de afmeting van de kleurvlek constant bleef.

Als *kleurstof* gebruikten wij aanvankelijk, zoals gebruikelijk, Evans Blue. Deze kleurstof blijft lang in bloed en weefsel van het proefdier. Doet men nu bij een dier eerst de A.C.A.-test en neemt men enige uren later bloed af om het serum hiervan voor de P.C.A.-test te gebruiken, dan blijkt dit serum blauw gekleurd. Intracutane injectie van een dergelijk serum ver-

oorzaakt een blauwe vlek in de huid. Het is daardoor mogelijk dat een zwak positieve P.C.A.-reactie niet waargenomen kan worden. Bloed afnemen direct voor het uitvoeren van de A.C.A.-proef had het bezwaar, dat het noodzakelijk manipuleren met de dieren voor de hartpunctie en de eventueel daarbij toegepaste narcose de A.C.A.-reactie zou kunnen storen (Ovary 1958). Zoals aangegeven is door Feinberg en Dewdney (1962) kan deze moeilijkheid overwonnen worden door het gebruik van Coomassie-blue. Deze kleurstof wordt snel weer uitgescheiden, in hoofdzaak door de nier. De kleuring van het serum blijkt 4 uur na injectie zodanig verminderd, dat een P.C.A.-test met dit serum niet meer gestoord wordt. De kleurstof heeft nog een ander voordeel. Hij komt ook na intraperitoneale inspuiting gemakkelijk in de bloedbaan. De techniek van inspuiten is dan aanmerkelijk eenvoudiger. Door combineren van uitwendige aflezing van de reactie en gebruikmaking van Coomassie-blue kan het dier in leven gelaten worden na de A.C.A.-test en kan enkele uren later bloed gewonnen worden voor de P.C.A.-test.

Ook bij dit onderzoek wordt als proefdier de cavia gebruikt.

Als antigeen gebruiken wij een waterig extract van kalfsthymusweefsel, dat werd verkregen en bewaard zoals beschreven is op blz. 36. Het voorschrift voor de extractbereiding vindt men in het aanhangsel op blz. 2.

Aan de experimenten ter beantwoording van de op bladz. 48 gestelde vraag, moest een aantal inleidende proeven voorafgaan. Wij gingen na of een cavia door eenmaal inbrengen van door bevriezing geconserveerd kalfsthymusweefsel gesensibiliseerd wordt tegen antigeen uit dit weefsel (proef 1). Daarna onderzochten wij of sensibilisatie van de cavia door implantatie van D.V.-bot of H_2O_2-bot, met behulp van ditzelfde antigeen kan worden aangetoond (proef 2). Ook onderzochten wij hoe de A.C.A.-test met dit antigeen verloopt bij niet gesensibiliseerde cavia's (proef 3). Tenslotte onderzochten wij de sensibilisatie van de cavia door implantatie van geconserveerd thymusweefsel bij verschillend lange implantatieduur (proef 4).

Proef **1:** P.C.A.-test met serum van cavia's die behandeld zijn met implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel.

Vraagstelling: reageert de cavia op inplanten van geconserveerd kalfsthymusweefsel met vorming van circulerende antilichamen gericht tegen een antigeen in dit kalfsthymusweefsel?

Proefopstelling: bij 3 cavia's werden per dier 4 stukjes geconserveerd kalfsthymusweefsel subcutaan ingebracht. Op dag 7, 10 en 14 na de implantatie werden de dieren in narcose gebracht en werd hartpunctie verricht.

Het verkregen bloed werd afgecentrifugeerd gedurende vijf minuten, bij langzaam stijgend toerental tot vijfduizend toeren per minuut. De sera van gelijke afnamedag werden gemengd en daarna bewaard bij —20° C.

Uitvoering van de P.C.A.-test: de sera verkregen na implantatieduur van 14 dagen werden als volgt getest. Bij 2 cavia's werd op 3 verschillende plaatsen intracutaan 0.1 cc ingespoten van respectievelijk onverdund, 25 × verdund en 50 × verdund testserum. Ter controle diende een injectie van 0.1 cc. physiologisch zout. De sera werden met physiologisch zout verdund.

Drie uur na de intracutane injectie volgde intraveneus inspuiten van 1 cc thymusextract samen met 0.5, 0,5%, cc Evans-blue.

Resultaat: bij beide dieren trad na 3 minuten blauwkleuring om de injectieplaats van het onverdund serum op. Alle drie de serum-injectieplaatsen toonden bij beide dieren na 10 minuten een blauwe vlek. Afmeting van de vlek en intensiteit van de blauwe kleur namen af met stijgende verdunning. De injectieplaats van het physiologisch zout bleef steeds kleurloos. Herhaling van deze proef enkele dagen later, waarbij dezelfde testsera beproefd werden met een nieuw bereid thymusextract, leverden dezelfde uitkomst op.

Conclusie: de positieve reactie bij testserum-verdunning × 50 bewijst de aanwezigheid van circulerende antilichamen tegen één of meer antigenen in het extract van kalfsthymusweefsel, dwz.: 14 dagen na implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel bevatte het bloed van het proefdier circulerende antilichamen tegen antigenen in kalfsthymusextract.

Verder leerde ons deze proef ook dat de cavia herhaalde, elkaar vrij snel opvolgende, hartpuncties in narcose goed verdraagt.

Proef **2:** A.C.A.-test bij cavia's die behandeld zijn met implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel, D.V.-bot of H_2O_2-bot.

Vraagstelling: veroorzaakt implantatie van geconserveerd thymusweefsel, D.V.-bot of H_2O_2-bot sensibilisatie tegen kalfsthymusantigenen die met behulp van de A.C.A.-reactie kan worden aangetoond?

Proefopstelling: 6 dieren werden verdeeld in groepen van 2, één groep voor elke implantaatsoort. Elk dier kreeg 4 subcutane implantaten ventraal. Alle dieren werden 14 dagen na de implantatie getest.

Uitvoering van de A.C.A.-test: intraveneus inspuiten van 1 cc 0.5% Evans-blue bij alle proefdieren en twee controle dieren. Direct daarna intracutaan inspuiten, in de onthaarde rughuid, van 0,1 cc van de volgende oplossingen: a. onverdund thymusextract; b. bovine albumine oplossing 0.05 mg per cc; c. physiologisch zout. Het bovine albumine werd gebruikt om inzicht te krijgen in het mogelijk belang van serumeiwitten in de implantaten voor de sensibilisatie der proefdieren. De dieren werden 30 minuten na de intracutane injecties gedood, de huid afgestroopt en de diameter van de kleurvlekken gemeten. Twee implantaten van elk proefdier werden uitgenomen voor histologisch onderzoek.

De uitkomsten van de proef zijn verzameld in het aanhangsel in tabel 7 bladz. 8.

Resultaat: ter plaatse van de thymusextractinjecties toonden alle dieren een blauwe vlek. De reactie was bij de dragers van thymusweefsel en D.V.-bot het sterkst en vrijwel gelijk. Die bij de contrôledieren was ongeveer de helft zwakker. De reactie van de H_2O_2-botdragers lag tussen beide waarden in, maar dichter bij de contrôles. Ter plaatse van de injecties van physiologisch zout trad geen enkele maal een kleurvlek op groter dan 5 mm. Het bovine albumine gaf bij de controledieren en de H_2O_2-dragers een negatieve reactie. Bij twee van de drie D.V.-botdragers en bij beide thymusweefseldragers gaf het een, zij het geringe, positieve reactie.

De histologie van de locale weefselreacties om de verschillende implantaatsoorten toonde het beeld, beschreven in hoofdstuk II en III voor de proefduur van 14 dagen.

Conclusies: Met de A.C.A.-test is op dag 14 na de implantatie bij de dragers van geconserveerd kalfsthymusweefsel en van D.V.-bot sensibilisatie tegen antige(e)n(en) uit kalfsthymusweefsel aantoonbaar.

Het H_2O_2-bot veroorzaakte mogelijk een zwakke sensibilisatie.

Bij gebruik van onverdund kalfsthymusextract trad in de A.C.A.-test een aspecifieke reactie op (controledieren).

De weefselbeschadiging door de injectie zelf veroorzaakte geen positieve reactie. Dit bleek uit de injectie van physiologisch zout.

Kalfsthymusweefsel en D.V.-bot bevatten geen belangrijke hoeveelheid antigeen, dat nauw verwant is met bovine serumalbumine. Bij gebruik van waterig thymusextract als antigeen, spelen eiwitten afkomstig uit het

bloedserum dus blijkbaar geen belangrijke rol. Immers, van de serum eiwitten is alleen het albumine in water oplosbaar.

Proef **3:** Pseudo „A.C.A.-test" bij niet gesensibiliseerde cavia's door testen met thymusextract in opklimmende verdunning met physiologisch zout.

Vraagstelling: kan door verdunning van het thymusextract de in proef 2 gevonden aspecifieke reactie op het extract worden vervminderd? Zo ja bij welke verdunning komt de reactie overeen met die bij injectie van physiologisch zout?

Proefopstelling: bij 2 cavia's werd intracutaan ingespoten: 0.1 cc thymusextract in de verdunningen × 1, × 10, × 25 en × 50, en 0.1 cc physiologisch zout. Elk dier ontving dus 5 injecties. Direct daarna werd intraveneus 1 cc 0.5% Evans-blue toegediend. Het resultaat werd, na zorgvuldig ontharen van de huid, uitwendig afgelezen met behulp van de beschreven maatschaal.

Resultaat: de uitkomsten van deze proef zijn verhandeld in tabel 8 blz. 18 van het aanhangsel.

De diameter van de kleurvlekken om de injectieplaats van thymus-extract × 1, × 10 en × 25 zijn vrijwel gelijk. Bij verdunning van thymus-extract × 50 is de kleurvlek steeds duidelijk kleiner dan bij hogere concentraties, maar de diameter ligt toch dichter bij die van de andere extractvlekken dan bij de zeer kleine vlek om de injectieplaats van het physiologisch zout.

Conclusie: Ook in de hoogste hier gebruikte verdunning veroorzaakt thymus-extract nog een duidelijke reactie bij de niet gesensibiliseerde cavia.

Voor de definitieve proefopstelling van de A.C.A.-test werden de volgende verdunningen van het testextract gekozen: × 1, × 50 en × 100. Er werd steeds een niet gesensibiliseerd dier als controle gebruikt.

Proef **4:** A.C.A.-test bij cavia's, gesensibiliseerd door geconserveerd kalfsthymusweefsel en getest na een implantatieduur van 7 en 10 dagen.

Vraagstelling: hoeveel dagen na implantatie van geconserveerd kalfs-thymusweefsel kan met deze test sensibilisatie worden aangetoond?

Proefopstelling: bij 4 cavia's werden per dier 4 stukjes geconserveerd kalfsthymusweefsel ingebracht. Na 7 en 10 dagen werden telkens 2 dieren getest. De uitvoering van de A.C.A.-test geschiedde als in proef 2 op blz. 39. Er werd geen controletest gedaan.

De uitkomsten worden weergegeven in tabel 9 blz. 9 van het aanhangsel.

Resultaat: 10 dagen na de implantatie reageren de thymusdragende cavia's even sterk als in proef 2 na 14 dagen. De reactie 7 dagen na de implantatie is vergelijkbaar met die in proef 2 bij de H_2O_2-bot dragers.

Conclusie: Het is waarschijnlijk, dat de cavia 7 dagen na implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel reeds een zwakke graad van sensibilisatie vertoont. De sensibilisatie 10 dagen na de implantatie is, gemeten aan deze test, even sterk als na 14 dagen.

Uit deze inleidende experimenten kunnen wij de volgende conclusies trekken:

1. 14 dagen na implantatie van door bevriezen geconserveerd kalfsthymusweefsel bevat het bloed van de cavia anti-kalfsthymusantilichamen (proef 1).
2. 14 dagen na implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel of D.V.-bot zijn met de A.C.A.-test anti-kalfsthymus-antilichamen bij de profdieren aantoonbaar. 14 dagen na implantatie van H_2O_2-bot maakt de A.C.A.-test de aanwezigheid van anti-kalfsthymus-antilichamen waarschijnlijk (proef 2).
3. Sensibilisatie van de cavia door implantatie van D.V.-kalfsbot kan aangetoond worden met antigeen uit kalfsthymusextract. Beide directe huidanaphylaxiereacties zijn bruikbaar.
4. verdunning van het kalfsthymusextract met physiologisch zout tot 50 × heft de invloed van dit extract op de vaatdoorlaatbaarheid, en daarmee de aspecifieke werking in de A.C.A.-test, nog niet op (proef 3).
5. 7dagen na implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel is de A.C.A. reactie zwak positief. 10 dagen na deze implantatie is de A.C.A.-reactie even sterk als op dag 14.

Met behulp van de aldus verkregen gegevens werd nu een onderzoek verricht naar sensibilisatie van het proefdier door D.V.-bot en H_2O_2-bot bij verschillend lange proefduur.

Proef 5: A.C.A.-test 7, 10 en 14 dagen na implantatie van 4 schijfjes D.V.-bot, H_2O_2-bot of geconserveerd autoloog bot; P.C.A.-test met serum van dezelfde dieren, bij een proefduur van 7, 10 en 14 dagen.

Vraagstelling: hoe verloopt de sensibilisatie door deze implantaatsoorten van dag 7 tot dag 14 na de implantatie? Zijn er verschillen in graad van sensibilisatie door beide implantaatsoorten en zijn er verschillen in het tijdstip, waarop deze sensibilisatie met de gebruikte methodiek aangetoond kan worden?

In deze proef werd bij één reeks dieren autoloog geconserveerd bot geïmplanteerd. Hiervan kan men geen sensibiliserende werking verwachten. Zo kan de invloed van de implantatieoperatie en die van de aanwezigheid van een dood beenimplantaat, op de A.C.A.-test worden nagegaan.

Proefopstelling: 27 cavia's werden verdeeld in 3 groepen van 9 dieren, 1 groep voor elke implantaatsoort. Elk dier kreeg 4 implantaten.

Het autologe implantatiemateriaal werd verkregen en geconserveerd als beschreven op blz. 12.

De A.C.A.-test werd op dag 7, 10 en 14 na implantatie bij telkens 3 dieren van elke groep gedaan. Op de testdag werd een vers bereid thymusextract als antigeen gebruikt. Op elke testdag werd 1 controledier, dat dus geen implantaat droeg, getest. Bij het testen kreeg elk dier 4 intracutane injecties van resp. 0.1 cc onverdund kalfsthymusextract, 0.1 cc 50 × verdund extract, 0.1 cc 100 × verdund extract en 0.1 cc physiologisch zout. De reactie werd afgelezen na 30 minuten.

Nadat de A.C.A.-test was uitgevoerd werd bij elk proefdier tenminste 1 implantaat verwijderd voor histologisch onderzoek. Vervolgens werd bloed van het proefdier verkregen door hartpunctie. Het serum werd afgecentrifugeerd en ingevroren bij — 20° C. Alleen de sera van D.V.-botdragers en H_2O_2-botdragers werden verzameld.

P.C.A.-test: Deze proef werd uitgevoerd nadat alle sera verzameld waren. De sera werden per groep en per duur van implantatie gemengd en deze serummengsels zullen verder als volgt worden aangeduid: Serum D.V.-bot 7, D.V.-bot 10 en D.V.-bot 14 en serum H_2O_2-bot 7, H_2O_2-bot 10 en H_2O_2-bot 14. Serum D.V.-bot 7 betekent dus: mengsel van sera, afkomstig van de 3 dieren, geïmplanteerd met D.V.-bot, en gewonnen 7 dagen na implantatie.

De P.C.A.-test werd als volgt uitgevoerd: 2 cavia's werden intradermaal ingespoten met 0.1 cc onverdund serum D.V.-bot 7, D.V.-bot

10 en D.V.-bot 14 en vers serum van een niet gesensibiliseerde cavia. Vier uur later volgde intraveneuze injectie van 1 cc onverdund thymus-extract samen met ½ cc ½% Evans-blue. De reactie werd na 15 minuten afgelezen. Het testen van de H_2O_2-bot sera geschiedde op dezelfde wijze.

Het aflezen van de reactie werd steeds uitwendig gedaan. Het huidgebied voor de reacties werd enkele uren voor de proefneming kaal geknipt en onthaard.

Resultaat:

a. Uitkomsten van de A.C.A.-test. De gevonden waarden, weergevend de diameter van de kleurvlek in mm vindt men in tabel 10, 10A, en 10B op bladz. 9, 10 en 11 van het aanhangsel.

Op deze getallen pasten wij de waarderingsmethode toe, die Ovary gebruikt. Hierbij geeft men de sterkte van de reactie aan van 0 tot +++. Een vlek van 0 tot 5 mm doorsnede is 0; van 5 tot 10 mm +; van 10 tot 15 mm ++; van 15 tot 20 mm +++. Vereist is dat alle controle waarnemingen van de proef 0 zijn, dus de vlekken hier kleiner zijn dan 5 mm. Onze controlewaarnemingen bij provocatie met 100 × verdund tymus-extract voldoen vrijwel aan dit criterium. Tweemaal komt echter de waarde 6 voor, eenmaal de waarde 9. Laten wij de waarde 9 als een toevallige vondst buiten beschouwing, dan zullen we toch de waarde 6 negatief moeten noemen. Wij passen daarom de volgende verdeling toe; diameter 0 tot 7 mm = 0; 7 tot 12 mm = +; 12 tot 17 mm = ++; 17 tot 22 mm = +++. Tabel I (pag.44) geeft de uitkomsten van de A.C.A.-test uit proef 5 op deze wijze weer.

Implantatie van D.V.-bot veroorzaakte bij alle dieren sensibilisatie. Het H_2O_2-bot gaf na 10 en 14 dagen meestal een vrij zwakke sensibilisatie en na 7 dagen geen aantoonbare sensibilisatie.

Statistische analyse van de waarden uit de A.C.A.-test volgens de methoden van de variantie-analyse wees uit dat de H_2O_2-bot waarden zeer signifikant lager zijn dan de D.V.-bot waarden ($P \ll 0{,}001$). De getalreeksen waarop de analyse werd toegepast en de uitkomsten van de variantie-analyse vindt men in het aanhangsel op pag. 16.

b: uitkomsten van de P.C.A.-test: De gevonden waarden, weergevend de diameter van de kleurvlekken in mm, vindt men verzameld in tabel 11 op bladz. 11 van het aanhangsel.

Alleen de proeven met D.V.-botserum bleken goed afleesbare uitkomsten te geven. De H_2O_2-bot-sera gaven geen afleesbare reacties. Alle sera waren reeds blauw gekleurd doordat het bloed afgenomen werd nadat bij de A.C.A.-test Evans blue was ingespoten. De door deze

Tabel I

Implantaatsoort	Proefduur 7 dagen	10 dagen	14 dagen
D.V.-bot	+	++	++
,,	++	++	++
,,	++	++	++
H_2O_2-bot	0	+	0
,,	0	+	+
,,	0	++	+
Autoloog bot	0	0	0
,, ,,	0	0	0
,, ,,	+	0	
Controle	0	0	0
,,	0	0	0
,,	0	+	0

A.C.A.-test Proef 5 Thymusextract × 100

ø kleurvlek:

0-7 mm = 0; 7-12 mm = +; 12-17 mm = ++; 17-22 mm = +++

kleuring van de sera veroorzaakte blauwe vlek ter plaatse van de injectie stoorde het aflezen van de P.C.A.-test voor de D.V.-bot-sera niet, daar zich hier steeds binnen de vaag blauw gekleurde vlek een scherp begrensde diep blauwe ronde vlek vormde. De P.C.A.-test voor de H_2O_2-bot-sera was niet goed te beoordelen. Wel werd het centrum van de vlek meestal wat donkerder van kleur, maar de grens van dit gebied bleef steeds vaag zodat meting niet mogelijk was.

Tabel II geeft de uitkomsten van deze proef in de waardering 0 tot +++ weer. Hier is de oorspronkelijke schaal volgens Ovary toegepast omdat de controles negatief waren.

Tabel II

Neutraal serum	Serum D.V.-bot 7	Serum D.V.-bot 10	Serum D.V.-bot 14
o	++	+++	+++
o	++	+++	++

P.C.A.-test Proef 5

ø kleurvlek in mm:

o = 0 tot 5 mm; + = 5 tot 10 mm; ++ = 10 tot 15 mm; +++ = 15 tot 20 mm

De test is voor alle D.V.-bot-sera positief. De reacties zijn met D.V.-bot-serum 10 en 14 sterker dan met D.V.-bot-serum 7. Het controle-serum afkomstig van een niet behandelde cavia gaf steeds negatieve uitkomsten.

Ook de H_2O_2-bot-implantaten veroorzaakten dus een met de A.C.A.-test aantoonbare sensibilisatie van de proefdieren. Op de 10e dag bleek de reactie vrijwel even sterk als na D.V.-bot-implantatie. Verband tussen sensibilisatie van het proefdier en optreden van de locale walreactie wordt hierdoor twijfelachtig. Bestudering van de histologische reactie op de H_2O_2-bot-implantaten uit deze proef bracht echter een afwijkende histologische reactie aan het licht. Van de drie praeparaten van dag 7 toonden er twee een walreactie + en een ++. Op dag 10 was deze reactie driemaal ++. Vele botlacunes van deze implantaten bevatten bovendien nog osteocyten. Het H_2O_2-bot, dat in deze proef gebruikt was, bleek dus minder ver gezuiverd te zijn, dan dat, gebruikt in de proeven uit hoofdstuk II.

Proef **6:** Herhaling van de A.C.A.- en P.C.A.-test bij dieren, gesensibiliseerd door implantatie van D.V.-bot of H_2O_2-bot, waarbij als kleurstof voor de A.C.A.-test Coomassie-blue gebruikt wordt en waarbij slechts één botpastille per proefdier wordt ingeplant.

Vraagstelling:

1. hoe verloopt de sensibilisatie door deze implantaatsoorten, van de 10e tot de 21ste dag?
2. kan er bij sensibilisatie door H_2O_2-bot verband gelegd worden tussen de sterkte van de A.C.A.-reactie en de graad van zuivering van het implantaat?

Door het Coomassie-blue te gebruiken kon blauwkleuring van de P.C.A.-test-sera voorkomen worden.

De H_2O_2-bot pastilles werden vervaardigd uit drie verschillende spongiosablokken, genoemd A, B en C, waarin microscopisch een verschillende graad van zuivering geconstateerd was. Deze zuivering was steeds onvolledig. Bij elk proefdier werd één enkele pastille ingebracht. Hierdoor kan worden nagegaan of er verband is tussen extreme waarden van de A.C.A.-reactie en afwijkende histologische reactie bij hetzelfde dier.

Proefopstelling: er werden twee groepen gevormd, ieder van 18 cavia's,

voor elke implantaatsoort één groep. De implantatieduur bedroeg 10, 14 en 21 dagen en voor elke implantatieduur werden per implantaatsoort zes dieren getest. Ieder proefdier kreeg één standaard implantaat. De H_2O_2-implantaten waren afkomstig van drie verschillende blokken spongiosa, aangeduid als blok A, B en C. In elke groep van zes dieren kregen twee dieren implantaat A, twee dieren implantaat B en twee dieren implantaat C.

A.C.A.-test: deze geschiedde als in de vorige proef, maar de kleurstof was Coomassie-blue. Hiervan werd 2 cc 1.75% oplossing intraperitoneaal toegediend. De intracutane extractinjectie volgde na een kwartier. De reactie werd na 30 minuten afgelezen.

Drie uur na de intraperitoneale injectie volgde hartpunctie, daarna werd het dier opgeofferd en het implantaat ter bestudering weggenomen.

Voor alle proeven werd nu één thymusextract gebruikt, dat na de bereiding direct in een aantal porties werd verdeeld, ingevroren en bewaard bij —20° C. Op elke testdag werd 1 portie extract ontdooid, verdund en gebruikt. Omdat in al deze proeven dus hetzelfde thymusextract gebruikt is werd volstaan met één enkele reeks van 4 controledieren.

P.C.A.-test met de gemengde sera van dezelfde proefdieren: de sera werden aangeduid als serum H_2O_2-bot 10, 14 en 21 en serum D.V.-bot 10, 14 en 21.

De P.C.A.-test werd als volgt uitgevoerd. Per proefdier werd aan de rugzijde 0.1 cc van elk testserum ingespoten en wel rechts van de mediaanlijn H_2O_2-bot-serum 10, 14 en 21 en links van de mediaanlijn D.V.-bot-serum 10, 14 en 21. Elk dier ontving dus 6 injecties. Het aantal proefdieren bedroeg 3. Door deze proefopstelling kan men bij de beoordeling rekening houden met een eventuele abnormale individuele gevoeligheid van het proefdier. De intraveneuze injectie van 1 cc thymusextract en ½ cc Evans-blue werd 4 uur na de intracutane seruminjectie gegeven.

Resultaat:

a. De uitkomsten van de A.C.A.-test worden weergegeven in de tabellen 12, 12A en 12B op bladz. 12, 13 en 14 van het aanhangsel.

Tabel III geeft de uitkomsten bij provocatie met 100× verdund thymusextract weer in de waardering o tot +++ zoals die in tabel I op pag. 44 gebruikt is.

Het D.V.-bot blijkt op de 10e dag bij vele dieren sensibilisatie veroorzaakt te hebben. Na 14 en 21 dagen zijn vrijwel alle dieren gesensibili-

Tabel III

Implantaatsoort	Proefduur		
	10 dagen	14 dagen	21 dagen
D.V.-bot	0	0	+
„	0	+	+
„	+	++	+
„	+	++	+
„	+	++	++
„			++
„			++
H_2O_2-bot	0	+	0
„	0	+	+
„	0	+	+
„	0	+	+
„	+	+	+
„	+	++	++
Controle	0		
„	0		
„	0		
„	0		

A.C.A.-test Proef 6 Thymusextract × 100

seerd. De reactie 10 dagen na implantatie is zwakker dan in proef 5 bij dezelfde implantatieduur.

Het H_2O_2-bot heeft op dag 10 enkele dieren zwak gesensibiliseerd. Na 14 en 21 dagen reageren vrijwel alle proefdieren positief, maar de reactie blijft vrijwel steeds ten hoogste +.

Correlatie tussen de uiterste waarden en de implantaatsoorten A, B of C kon niet worden vastgesteld.

Statistische analyse van deze waarden met behulp van de methode der variantie-analyse wees uit dat de H_2O_2-botwaarden signifikant lager zijn dan de D.V.-botwaarden. $P < 0{,}03$ bij eenzijdige overschrijdingskans. Toetst men aan een tweezijdige overschrijdingskans dan is het verschil net niet signifikant bij de 5%-grens. ($P < 0{,}06$). De getalreeksen waarop de analyse werd toegepast en de uitkomsten van de variantie-analyse vindt men in het aanhangsel op pag. 17.

b. De uitkomsten van de P.C.A.-test zijn verzameld in tabel 13 op blz. 14 van het aanhangsel. Tabel IV geeft deze uitkomsten met de waar-

dering o tot +++. Ook hier werd de oorspronkelijke schaal van Ovary toegepast. Serum H_2O_2-bot 10 gaf steeds negatieve reacties en kan daarom als controle beschouwd worden, die dus steeds negatief was.

Tabel IV

Serum D.V.-bot 10	Serum D.V.-bot 14	Serum D.V.-bot 21	Serum H_2O_2-bot 10	Serum H_2O_2-bot 14	Serum H_2O_2-bot 21
+++	+++	+++	0	++	++
++	+++	+++	0	+++	++
++	++	+++	0	++	++

P.C.A.-test Proef 6

o = 0 tot 5 mm; + = 5 tot 10 mm; ++ = 10 tot 15 mm; +++ = 15 tot 20 mm

De test toont in het D.V.-bot-serum circulerende anti-kalfsthymus-antilichamen aan en bij langere implantatieduur een lichte stijging in het gehalte aan antilichamen. Het H_2O_2-bot-serum bevatte op dag 10 geen op deze manier aantoonbare antilichamen. Op dag 14 en 21 is er ook hier circulerend antilichaam, maar de P.C.A. is zwakker dan met D.V.-bot-serum van dezelfde implantatieduur.

Conclusie: Ook het H_2O_2-bot dat in deze proef gebruikt werd, heeft een aantal dieren gesensibiliseerd. De sensibilisatie die met de A.C.A.-test wordt aangetoond bleek op dag 14 vrijwel vergelijkbaar met die door D.V.-bot.

De P.C.A.-test toont op dag 14 en 21 antilichamen aan in het bloed van de proefdieren, die behandeld zijn met H_2O_2-bot. Deze reactie is bij de D.V.-bot dragende dieren bij deze proefduur veel sterker dan bij de H_2O_2-bot dragende dieren en bij hen ook op dag 10 reeds sterk positief.

De sensibiliserende werking van D.V.-bot wordt opnieuw aangetoond.

Welke component van dit H_2O_2-bot oefende de sensibiliserende werking uit? Moet deze factor gezocht worden in achtergebleven cellulaire bouwstoffen of in de botsubstantie, waarin men dan antigenen moet veronderstellen, die een grote verwantschap vertonen met de antigenen in ons thymusextract?

Wij hebben getracht het antwoord op deze vraag te vinden door een implantatieproef met verder gezuiverd H_2O_2-bot en met in de handel

verkrijgbaar op dezelfde manier bereid botweefsel, dat de naam „Kieler Span" draagt.

Proef **7:** A.C.A.-test en P.C.A.-test na implantatie van tweemaal gezuiverd H_2O_2-bot of „Kieler Span".

Vraagstelling: wordt de antigene werking van het H_2O_2-bot door verdere zuivering opgeheven?

Proefopstelling: Het H_2O_2-bot, dat in deze proef gebruikt werd, is verder gezuiverd door de gezaagde pastilles opnieuw in een 30% H_2O_2-oplossing te extraheren. Na 2 × 24 uur extractie bij 37° C., waarbij de H_2O_2-oplossing eenmaal ververst werd, bleken de schijfjes helder wit, ook bij doorvallend licht. Zij werden daarna nog 24 uur in physiologisch zout bewaard bij een temperatuur van 4° C. Microscopisch bevatten deze pastilles geen beenmergsresten meer en nog maar heel enkele osteocytresten. Pastilles, gemaakt van „Kieler Span", toonden nog enkele osteocytresten en soms een randje endost.

Twee groepen van zes cavia's werden behandeld, de ene groep met implantatie van gezuiverd H_2O_2-bot, de andere met implantatie van „Kieler Span". Elk dier kreeg 2 implantaten. Op dag 7, 10 en 14 werd, telkens bij 2 andere dieren uit elke groep, één der implantaten weggenomen. Bovendien werd op die dagen van tenminste 3 dieren uit elke groep door hartpunctie bloed afgenomen en het serum daarvan geconserveerd bij —20° C.

Op de 21ste dag droegen alle proefdieren nog 1 implantaat. Op die dag werd bij alle proefdieren de A.C.A.-reactie gedaan, waarbij als kleurstof Coomassieblue werd gebruikt. De A.C.A.-reactie werd uitgevoerd als beschreven in proef 6. Ter controle dienden 2 cavia's.

Op de 22e dag werd van alle proefdieren door hartpunctie bloed afgenomen en het serum weer bij —20° C. bewaard. Daarna werden de dieren opgeofferd en werd het tweede implantaat uitgenomen.

De sera werden door middel van de P.C.A.-reactie onderzocht op de aanwezigheid van antikalfsthymus-antilichamen. Deze proef werd in principe uitgevoerd als de P.C.A. uit proef 6, zodat elk proefdier 6 intracutane injecties van gemengd serum kreeg.

Er werden 4 proefdieren gebruikt. De verdeling van de sera over de proefdieren werd zo gekozen, dat elk serum bij tenminste 2 dieren getest werd. Hierdoor kon met een verschil van individuele gevoeligheid van de proefdieren rekening gehouden worden.

Omdat in deze proef alle sera een negatieve uitslag gaven werd de proef herhaald. Nu werden, naast de gemengde sera, ook de afzonderlijke sera van die dieren die de sterkste A.C.A.-reactie vertoonden, getest en tevens, ter controle van het gebruikte antigeen, op één plaats bij elk proefdier serum D.V.-bot 14 uit proef 5 ingespoten.

Resultaten:

a. histologische waarnemingen: de preparaten van de beide implantaatsoorten tonen op dag 7 en 10 een iets sterkere walreactie dan de H_2O_2-bot-implantaten uit de proef, beschreven in hoofdstuk II. De preparaten van dag 14 en 21 komen met die uit hoofdstuk II overeen.

b. A.C.A.-reacties: De uitkomsten worden weergegeven in tabel 14 op bladzijde 15 van het aanhangsel. Tabel V geeft de uitkomsten bij provocatie met 100 × verdund thymusextract weer in de waardering 0 tot +++ zoals gebruikt bij het opstellen van tabel I op blz. 60.

Tabel V

H_2O_2-bot	Kiel.-bot
0	0
0	0
0	0
0	0
0	+
0	+

A.C.A.-test Proef 7 Thymusextract × 100 Proefduur 21 dagen

Het „zuivere" H_2O_2-bot veroorzaakt geen enkele maal een positieve reactie. Na implantatie van Kieler bot is de reactie 2 × net +.

c. P.C.A.-reacties: De gemengde sera gaven geen enkele maal een positieve reactie. Ook afzonderlijk gaven geen van deze sera een positieve reactie, terwijl de P.C.A.-test voor het serum D.V. 14 in alle geteste dieren positief was.

Conclusies: Bij de dragers van nogmaals gezuiverd H_2O_2-bot toonden noch de A.C.A.-test noch de P.C.A.-test sensibilisatie aan.

Enkele dragers van de „Kieler Span" waren, gezien de uitslag van de A.C.A.-test, mogelijk zwak gesensibiliseerd. De P.C.A.-test kon ook bij deze dieren geen circulerende antilichamen aantonen.

Het resultaat van deze proef maakt de veronderstelling, dat de sensibi-

liserende werking der H_2O_2-bot implantaten in proef 5 en proef 6 berustte op verontreiniging door resten kernhoudend kalfsweefsel, zeer aannemelijk.

Conclusies uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten

Uit deze proeven blijkt, dat met behulp van kalfsthymusextract als antigeen, na subcutaan inplanten van gedood en geconserveerd kalfsthymusweefsel, bij de cavia antilichamen tegen kalfsthymus kunnen worden aangetoond, zowel met de A.C.A.-test als met de P.C.A.-test. De sensibilisatiegraad, bepaald met de A.C.A.-test, stijgt tussen de 7e en 10e dag na implantatie en is op de 10e dag reeds maximaal (proef 1, 2 en 4).

Na implantatie van D.V.-bot kunnen met ditzelfde kalfsthymusantigeen eveneens antilichamen tegen kalfsweefsel worden aangetoond. Het verloop van de sensibilisatie vertoont een grote gelijkenis met die na inplanten van geconserveerd kalfsthymusweefsel. In de A.C.A.-test is aanwezigheid van antilichamen op de 7e dag na implantatie al duidelijk. Het gehalte stijgt snel tot de 10e dag en daarna langzaam verder tot de 21ste dag. Ook in de P.C.A.-test is het serum van de 10e dag duidelijk positief en stijgt de titer tot tenminste de 21ste dag (proef 5 en 6).

Implantatie van geconserveerd autoloog botweefsel gaf slechts één enkele positieve A.C.A.test. Dit bevestigt de specificiteit van de testmethodes (proef 5).

Na implantatie van H_2O_2-bot vinden wij, in proef 5 en 6 met behulp van de A.C.A.-test en in proef 6 met de P.C.A.-test, met kalfsthymusextract aantoonbare sensibilisatie. De gemiddelde waarde van de waarnemingen in de A.C.A.-test boven die van de controles wisselt. In proef 5 ligt het maximum bij dag 10, in proef 6 bij dag 14. In beide gevallen wordt bij langer voortzetten van de proef de reactie geringer. De hoogste waarden uit de A.C.A.-tests benaderen de waarden, gevonden bij de D.V.-bot dragers. De waarden van de P.C.A.-test in proef 6 blijven op dag 14 en 21 duidelijk beneden die van het D.V.-serum. Uit deze gegevens moeten wij de conclusie trekken, dat ook de H_2O_2-bot-implantaten in proef 5 en 6 oorzaak waren van het vormen van antilichamen door het proefdier. Proef 7 toont aan, dat H_2O_2-bot bij voldoende reiniging geen sensibiliserende werking uitoefent. Hierdoor wordt het waarschijnlijk, dat de sensibilisering van de proefdieren door het H_2O_2-bot in de proeven 5 en 6 berustte op aanwezigheid van resten van beenmergweefsel en van osteocyten in de implantaten.

De P.C.A.-reactie is bij de H_2O_2-bot dragende dieren steeds veel zwakker dan bij de D.V.-bot dragende. De A.C.A.-reactie in proef V op dag 10 en in proef 6 op dag 14 is vrijwel even sterk bij H_2O_2-bot en D.V.-bot dragers.

Het is mogelijk, dat beide tests verschillende antilichamen aantonen. Waarschijnlijker lijkt ons de veronderstelling, dat de A.C.A.-test weefselgebonden antilichamen aantoont en dat alleen bij een hoge sensibilisatiegraad circulerende antilichamen in voldoende hoeveelheid aanwezig zijn om te kunnen worden aangetoond. Ovary (1964) constateert een positieve A.C.A.-reactie bij negatieve P.C.A.-reactie, wanneer de antilichaamproductie op gang komt, zonder hiervoor een verklaring te geven.

HOOFDSTUK V

DISCUSSIE VAN DE RESULTATEN. CONCLUSIES

De histologische reactie op geconserveerd heteroloog botweefsel

In hoofdstuk II beschreven wij als kenmerkend voor de reactie op implantatie van geconserveerd heteroloog botweefsel de volgende verschijnselen. Er trad een ontstekingswal om het implantaat op bij een implantatieduur van 7 en 10 dagen en er kwamen talrijke plasmacellen en lymphocyten in de implantaten voor bij een duur van 14 en 21 dagen. Steeds was er een matige granulocyteninfiltratie, die na de 10e dag duidelijk afnam. De granulocyten waren de eerste gastheercellen die het implantaat binnendrongen, waarbij zij de vetcellen in het implantaat vermeden. Later werden deze cellen gevolgd door jonge bindweefselcellen en histiocyten. Vanaf de 14e dag was de wal van ontstekingsweefsel verdwenen en bestond er een dunne fibreuze kapsel om de implantaten. In de periferie van het implantaat kwamen tegen het botweefsel steeds vele rondkernige reuzencellen voor.

Het is de vraag of deze kenmerken typerend zijn voor de reactie veroorzaakt door heteroloog weefsel, door heteroloog botweefsel of door geconserveerd heteroloog botweefsel. Wij hebben getracht deze vraag door een literatuuronderzoek te beantwoorden.

Het aantal mededelingen over de reactie op geconserveerd heteroloog botweefsel, vooral in de eerste dagen na implantatie, is klein.

Stagnara en Dubost-Perret (1950) vinden om implantaten van door bevriezen geconserveerd kalfsbot, aangebracht in of tegen de pijpbeenderen van honden, na een implantatieduur van 60 dagen, fibreuze afkapseling van de implantaten. Zij onderzochten geen jongere stadia.

Guilleminet, Stagnara en Dubost-Perret (1953) onderzochten dergelijke implantaten na 6 maanden en delen over de histologie weing mede.

Dezelfde onderzoekers (1957) merken op, dat bevroren kalfsbot veel langzamer wordt opgenomen in de structuur van het botstuk, waarnaar

het verplant werd, dan autoloog bot en adviseren gebruik van droog-gevroren heteroloog bot, dat beter zou voldoen.

Anderson, Schmidt en Lecocq (1959) onderzochten de vaatreactie om implantaten van in runderplasma bij 4° C. bewaard kalfsbot, dat in de voorste oogkamer van ratten was ingebracht, en vonden bij implantatie van blokjes bot alleen een vaatnet tegen de implantaten zonder binnendringen van vaten in het been. Een pasta, gemaakt van hetzelfde materiaal, werd geheel doorgroeid door vaten en veroorzaakte een sterke ontstekingsreactie.

Bauermeister (1960) vond bij geconserveerde heterologe spanen, geplaatst in een kanaal in spongieus bot, steeds o p de 15e dag een meer of minder sterke vorming van collageen bindweefsel om de implantaten.

Anderson, Dingwall, Schmidt en Lecocq (1961) zagen om in runderplasma geconserveerd kalfsbot, dat gebracht was in de voorste oogkamer van ratten, bij gebruik van een pasta na een week veel granulatieweefsel met ontstekingscellen en enkele reuzencellen. Na 2 weken was het aantal reuzencellen toegenomen. De reactie was verder onveranderd. Pas na de 3e week nam de ontstekingsreactie af en trad een bindweefselkapsel om de implantaten op.

Alleen bij Bauermeister en Anderson en medewerkers vonden wij gegevens over de vroege weefselreactie. Het implantatiemilieu is bij de laatste onderzoekers sterk verschillend van het onze. De beschreven reactie toont evenwel tot de 14e dag grote overeenkomst met wat wij waargenomen hebben.

Omtrent de reactie op vers verplant heteroloog botweefsel bij korte implantatieduur vonden wij meer gegevens.

Anderson, Dingwall, Schmidt en Lecocq (1961) brachten vers kalfsbot in de voorste oogkamer van de rat. Na één week was er een ontstekingsreactie van mononucleaire en neutrophiele cellen in los fibroblastisch bindweefsel om de implantaten. Na 2 weken kwamen hier reuzencellen bij. Na 3 weken was er nog een matige ontstekingsreactie met mononucleaire cellen, lymphocyten, en plasmacellen. De reuzencellen lagen steeds tegen de botbalkjes aan. Het implantaat was na 3 weken geheel omgeven door fibreus weefsel. De ontstekingsreactie bleek nog aan te houden tot de 10e week om daarna snel af te nemen.

Siegrist en Enneking (1961) zagen om stukken van de femurschacht van de rat, die verplant waren naar het femur van de goudhamster, op de 15e dag een celrijke laag weefsel, bestaande uit fibroblasten, lymphocyten en enkele reuzencellen; een laag die het implantaat sequestreert.

Op de getoonde afbeelding is het bindweefsel fibreus, met oriëntatie van de vezelbundels evenwijdig aan het implantaatoppervlak.

Koski en Laaksonen (1962) beschrijven transplantaten van foetaal menselijk botweefsel in het subcutane weefsel van de rat. Zij vonden een „typische afweercelreactie" na 11 en 21 dagen implantatie, een reactie, die bij langere implantatieduur ontbreekt.

De beelden die deze onderzoekers beschrijven, tonen veel overeenkomst met de door ons gevonden reactie op door bevriezen geconserveerde implantaten. Het bevriezen en bevroren bewaren verandert de inwerking van de implantaten op hun omgeving niet beduidend. Judet en Judet (1954) komen tot dezelfde conclusie en verwerpen hun eerder opgestelde theorie, dat bevriezen de antigene eigenschappen van de implantaten zou verminderen.

Hoe is de reactie na implantatie van heteroloog weefsel, dat geen botweefsel bevat?

Fleisher (1918) onderzocht de reactie op stukjes nierweefsel van cavia's, die getransplanteerd werden naar konijnen. Hij vond een granulocytenreactie met voorop gaan van deze cellen bij de penetratie van het implantaat, een sterke bindweefselreactie om de implantaten op de 7e en de 10e dag, en op de 14e dag een fibreuze kapsel om het implantaat. Intussen was dan het nierweefsel grotendeels vervangen door jong bindweefsel.

Loeb en Harter (1926) vonden bij transplantatie van kraakbeen en vetweefsel van konijn naar cavia een sterke activiteit van het bindweefsel met binnendringen van gastheerweefsel in het implantaat na de 8e dag, waarbij weer leucocyten voorgaan. Deze leucocyten zijn steeds aanwezig in hun preparaten. Lymphocyten komen in de 2e week in de ontstekingswal om het implantaat voor en dringen daarna samen met het bindweefsel de implantaten binnen.

Peacock (1959) verplantte peesweefsel van de hond subcutaan bij het konijn. Vanaf de 6e dag vond hij degeneratie van de peesweefselcellen en daarna snel verdwijnen van deze cellen en van de grondsubstantie van het peesweefsel. Hiermede gepaard ging een ophoping van lymphocyten, eosinophile granulocyten en andere mononucleaire cellen om het implantaat. Pas wanneer de donorcellen en de peestussenstof verdwenen waren, drongen de gastheercellen in de implantaten door.

Chesterman en Franks (1960) namen bij transplantatie van vers menselijk embryonaal longweefsel naar muizen, gedurende de eerste 15 dagen vervanging van het longweefsel door dicht fibreus weefsel waar en diffuze

infiltratie met polymorphkernigen en soms met plasmacellen. Zij konden niet vaststellen of dit bindweefsel van een gastheer of van het implantaat afkomstig was.

De aangehaalde onderzoekingen maken het o.i. aannemelijk, dat de reacties, die door ons om bevroren heteroloog botweefsel werden waargenomen typisch zijn voor de reactie om getransplanteerd heteroloog weefsel in het algemeen. Alleen de reuzencellen zijn kenmerkend voor de reactie op botweefsel.

De omslag van een dikke granulatiewal om de implantaten in een dunne fibreuze kapsel tussen de 10e en de 14e dag na implantatie wordt alleen door Fleisher beschreven.

De histologische reactie om implantaten van gemacereerd heteroloog botweefsel

In hoofdstuk II stelden wij vast, dat om implantaten van H_2O_2-bot zowel het optreden van een walreactie als de later volgende infiltratie van rondkernigen en plasmacellen ontbreekt. De ruimte tussen de botbalkjes, waaruit het beenmerg verwijderd was, bleek na een implantatieduur van 7 dagen gevuld te zijn met een fibrinenet waarin enkele granulocyten lagen. Aan de randen drong reeds jong bindeweefsel de implantaten binnen. Op de 10e dag was meestal het hele implantaat doorgroeid met jong bindweefsel. Vanaf de 7e dag zagen wij reuzencellen tegen de botbalkjes liggen. Op de 60e dag vonden wij ook in deze implantaten plasmacellen. De implantaten waren dan reeds voor een groot deel geresorbeerd, dit in tegenstelling tot de D.V.-bot implantaten. Overigens vertoonden beide implantaatsoorten op dag 60 hetzelfde beeld.

Omtrent de weefselreactie op met behulp van waterstofperoxyde gemacereerd botweefsel vonden wij in de literatuur de volgende gegevens.

Bauermeister (1958) zag bij implantatie van H_2O_2-kalfsbot bij honden geen ontstekingsreactie. Hij beschrijft ingroeien van een jong „kiemweefsel zonder vezelvorming" in de holten van de implantaten en acht dit de gunstigste reactievorm.

Kupperman (1960) vermeldt bij hetzelfde implantatiemateriaal alleen langzame en reactie-arme genezing.

Haasch (1961) onderzocht intramusculaire implantaten van H_2O_2-kalfsbot bij de mens na 9, 14, 28 en 36 dagen. Hij vond vezelrijk bind-

weefsel tegen de botbalkjes, een matige cellulaire infiltratie en weinig reuzencellen. Een granulatiewal om de implantaten ontbrak steeds. Bij een implantatieduur van 28 en 36 dagen vond hij botvorming tegen het ingebrachte botweefsel.

Hancox, Owen en Singleton (1961) zagen bij H_2O_2-bot na 17 dagen een vezelrijk bindweefsel in de ruimte tussen de botbalkjes en plaatselijk soms ophopingen van plasmacellen en lymphocyten. De reactie bij een kortere implantatieduur werd niet nagagaan en een beschrijving van het microscopische beeld van de implantaten vóór implantatie ontbreekt. Beoordeling van de graad van zuivering van deze implantaten is daardoor niet mogelijk, hoewel dit, vooral wegens het soms optreden van plasmacellen, wel gewenst zou zijn.

In 1954 beschreven Williams en Irvine een maceratiemethode van botweefsel met aethyleendiamine. Met behulp van deze stof blijkt ook het collageen uit de bottussenstof vrijwel geheel aan het weefsel te worden onttrokken.

Losee en Hurley (1956), Zeier en Stinchfield (1960), Bassett, Hurley en Stinchfield (1962) en Melcher en Irving (1963) vermelden, dat na implantatie van dit materiaal afweerreacties van de gastheer ontbreken. Losee en Hurley zien snelle resorptie van de implantaten zonder dat reuzencellen optreden. De andere onderzoekers beschrijven juist vertraagde resorptie, vergeleken met die bij vers autoloog bot. Melcher en Irving (1963) zien wel reuzencellen en merken bovendien een duidelijke vertraging op van botvorming in een corticalisdefect, waarin stukjes van dit botmateriaal werden aangebracht. Hoewel histologische tekenen van afweer dus zouden ontbreken blijkt de gastheerreactie toch, en wel in ongunstige zin, beïnvloed te zijn.

Een aantal Amerikaanse auteurs deelt gegevens mee over implantatieproeven met geprepareerd heteroloog botmateriaal, waaraan door de bewerking antigene stoffen onttrokken zouden zijn. Het procédé wordt echter niet meegedeeld. Gresham en Thomas (1962) zagen bij implantatie in een vers gemaakt botdefect, een sterke osteoclasie en vascularisatie van het implantaat optreden, wat leidde tot snelle resorptie. Het maximum van deze recactie viel in de 3e week. De sterke cellulaire infiltratie in de vroege implantatiephase doet volgens schrijvers aan ontstekingsreactie denken, maar zij menen niet met ontstekingscellen, maar met jonge cellen met osteoblastische potentie te maken te hebben, omdat er zo snel een krachtige botvorming in de implantaten optreden. Na 10 weken is reeds

90% van een dergelijk implantaat vervangen door een nieuw gevormd botweefsel. Bassett en Chreighton (1962) vinden bij dierproeven met ditzelfde botpreparaat na een implantatieduur van 30 dagen sterkere resorptie van het materiaal dan bij autoloog bot. Er zijn veel osteoclasten, maar er is geen ontstekingsreactie.

Algemeen constateerde men dus, dat om implantaten bestaande uit tussenstof, waaruit ook nog soms het collageen verwijderd was, geen ontstekingsreactie optreedt. Alleen Hancox en medewerkers zien soms, bij een proefduur van 17 dagen, plasmacellen. Men kan als verklaring hiervoor een onvoldoende reiniging van de implantaten veronderstellen. Wanneer zij n.l. aethyleendiamine gebruikten voor de maceratie zagen zij in de implantaten geen plasmacellen. Onze conclusie, dat heteroloog botweefsel na goede maceratie geen histologische afweerreactie van de kant van de gastheer verwekt, stemt overeen met de waarnemingen van de hier aangehaalde auteurs.

De weefselcomponent in het geconserveerde heterologe implantaat die de weefselreactie veroorzaakt

Ons onderzoek, beschreven in hoofdstuk III, leidde tot de volgende conclusie. Vorming van een ontstekingswal om het D.V.-bot-implantaat en sterke plasmacelinfiltratie van het implantaat gaan beide samen met de aanwezigheid van heterologe kalfsweefselcellen in dit materiaal.

Een met de onze vergelijkbare analyse van de werking der verschillende samenstellende elementen van het botimplantaat konden wij in de literatuur niet vinden. De conclusies van het onderzoek van Moss (1962) lijken echter met de onze in strijd te zijn. Deze onderzoeker vergeleek de reactie van ratten op 2 soorten vissenbot, waarvan de ene soort osteocyten bevat, de andere a-cellulair is. Hij constateerde bij subcutane implantatie een vroeg optredende „immuun-reactie" en daarna geleidelijk vormen van een kapsel uit dicht bindweefsel om de implantaten. Deze kapsel was na de 2e week goed gevasculariseerd en de ontstekingsreactie was dan nog maar gering. Moss achtte de reactie op cellulair en acellulair bot gelijk. Hij vond in het cellulaire bot, na een implantatieduur van 30 dagen, nog vele levende osteocyten. Zijn conclusie is, dat nucleaire en protoplasmatische stoffen geen rol spelen bij het ontstaan van de gastheerreactie.Men kan hier tegen aanvoeren, dat de botcellen in de cellulaire implantaten blijkbaar door de bottussenstof werden afgeschermd en niet in een directe relatie traden met cellen en weefselvochten van de gastheer.

Het is anders niet goed te begrijpen, dat zij 30 dagen na de implantatie nog levend zouden kunnen zijn. Omgekeerd is dan ook een sterke beïnvloeding van de gastheer door deze cellen of door producten van deze cellen niet waarschijnlijk. Het is daarom o.i. niet verantwoord uit deze proeven te besluiten, dat ook bij implantatie van heteroloog botweefsel, afkomstig van zoogdieren, de ingebrachte cellen geen rol spelen bij het verwekken van de gastheerreactie. Bovendien laten de door Moss afgebeelde microfoto's naar onze mening steeds bij de cellulaire implantaten een sterkere bindweefselreactie en cellulaire infiltratie zien, dan bij de acellulaire implantaten.

De sensibilisatie van de proefdieren

Het onderzoek, dat beschreven is in hoofdstuk IV toont aan, dat het geconserveerde heterologe botimplantaat de proefdieren sensibiliseert tegen antigenen, die aanwezig zijn in geconserveerd thymusweefsel van dezelfde donorsoort. De mate van sensibilisatie is na implantatie van geconserveerd thymusweefsel en geconserveerd spongieus botweefsel gelijk. De dieren zijn 7 dagen na de implantatie duidelijk gesensibiliseerd en de sensibilisatie is na 10 dagen vrijwel maximaal. Het bloed van deze dieren bevat antilichaam tengen antigeen uit thymusweefsel van de donorspecies. Spongieuse botmatrix, gezuiverd volgens de methode Bauermeister, bleek bij voldoende zuivering een enkele maal geringe sensibilisatie, getest met dit antigeen, te verwekken. Met de passieve huidanaphylaxie kon geen sensibilisatie meer worden aangetoond.

Omtrent sensibilisatie van proefdieren door heterologe weefselimplantaten konden wij in de literatuur betrekkelijk weinig gegevens vinden.

Men heeft deze sensibilisatie op verschillende manieren trachten aan te tonen. Enkele onderzoekers trachtten bij implantaat dragende dieren een anaphylactische shock te verwekken. Anderen zochten naar praecipiterende antilichamen in het serum van de dieren, of trachtten door herhaald inspuiten van extracten van botweefsel, afkomstig van de donor van de implantaten, een „second-set" fenomeen te verwekken. Ook wekte men tolerantie voor een bepaald heteroloog huidimplantaat op en ging na of serum, afkomstig van dieren die met dezelfde huid geïmplanteerd waren, deze tolerantie kon opheffen. Door onderzoek van de regionale lymphklieren van de implantatieplaats ging men na of heterologe implantaten

een lymphklierreactie verwekken, die op antilichaam produktie zou kunnen wijzen.

Judet en Judet (1954) vonden, dat intraveneus toedienen van paardenserum bij cavia's 3 weken na intramusculaire implantatie van vers of bevroren veulenbot steeds een dodelijke anaphylactische reactie verwekte. Werd gekookt botweefsel ingebracht, dan trad deze reactie niet op. Zij concludeerden tot antigene werking van een eiwitcomponent in het botweefsel, welke component door koken vernietigd wordt.

Kienholtz en Kemkes (1956) zagen hetzelfde bij inplanten van drooggevroren runderbot en provocatie met antitetanus- of antidiphterieserum afkomstig van het rund. Gebruikten zij als implantaat H_2O_2-bot, dan traden geen shockverschijnselen op. Deze laatste proef werd slechts met 2 dieren uitgevoerd. Het proefdier was het konijn.

Barbieri (1959) kon echter bij cavia's noch door toedienen van paardenserum nadat paardenbot was ingeplant, noch bij inplanten van paardenbot na sensibiliseren met paardenserum shockverschijnselen opwekken, hoewel in zijn conroleproeven bij provoceren door intraveneus serum in te spuiten 3 weken na sensibilisatie met hetzelfde serum, steeds dodelijke anaphylactische shock optrad.

Curtiss en Herndon (1955) toonden in het bloed van konijnen na implantatie van hondenbot een hoge titer van agglutininen tegen hondenerytrocyten aan. Zij achtten het zeer onwaarschijnlijk, dat een weefsel als bot, wanneer het ontdaan is van cellulaire elementen, veel antigeen zou kunnen bevatten.

Siegrist en Enneking (1960) wier uitkomsten over de histologische reactie reeds genoemd zijn, onderzochten in hun proefopstelling, waarbij rattenbotimplantaten werden ingebracht bij de goudhamster, ook de invloed van een, vanaf de implantatiedag dagelijks ingespoten homogenisaat van ontkalkt rattenbot. Zij zagen een versterking van de gastheerreactie op de 15e dag na de implantatie, met vorming van een celrijke laag, bestaande uit lymphocyten fibroblasten en reuzencellen, om de implantaten. Zij konden echter in de sera van hun proefdieren met behulp van praecipatiereacties geen antilichamen aantonen.

Häsková, Chŭtna, Häsek en Hort (1962) verwekten bij 2 eendensoorten in exemplaren van de ene soort tolerantie voor huidtransplantaten afkomstig van de andere soort. Het bleek, dat serum, afkomstig van een niet tolerant gemaakt maar wel met huidtransplantaten van dezelfde donor gesensibiliseerd dier, wanneer dit intraperitoneaal toegediend werd bij een tolerant dier, de tolerantie ophief. Dit serum bevatte dus antilichamen tegen huidweefsel afkomstig van de donor. Zij onderscheidden

in dit antiserum praecipitinen, die een vasculaire reactie opwekken, en cytotoxische antilichamen, die directe beschadiging van de cellen van de transplantaten veroorzaken. De tweede groep antilichamen is niet praecipiterend.

Craigmyle (1958) onderzocht de reactie in de regionale lymphklier op homologe en heterologe kraakbeenimplantaten. Op de 4e dag na implantatie bleek bij een heteroloog implantaat het gewicht van de lymphklier steeds belangrijk toegenomen te zijn. De klieren toonden in de schors een sterke toename van het aantal grote en middelgrote „lymphoide" cellen. De gewichtstoename was 8 dagen na de implantatie maximaal. Deze lymphklierreactie betekent activiteit van het immunologisch apparaat, verwekt door locaal aangeboden antigeen. Craigmyle implanteerde subcutaan in één oor bij konijnen. Op de 8e dag bleek ook de regionale klier van het niet geopereerde oor geactiveerd te zijn, zodat dan een algemene sensibilisatie van het dier aangenomen moet worden, omdat directe lymphbaanverbindingen tussen de contra-laterale klieren niet zouden voorkomen.

Van de aangehaalde onderzoekers toonden alleen Curtiss en Herndon op directe wijze antilichamen aan. De verschillende aangegeven methodieken zijn niet gemakkelijk zo in te richten, dat men bij hetzelfde proefdier op verschillende tijdstippen, zowel de histologische reactie als het optreden van antilichamen kan aantonen. Siegrist en Enneking die dit trachtten te doen, konden geen antilichaam aantonen. Met onze methodiek konden wij dit probleem op betrekkelijk eenvoudige wijze onderzoeken.

De localisatie van het antigeen in de heterologe implantaten

Wij vonden in hoofdstuk III een correlatie tussen aanwezigheid van cellulaire beenmergelementen in de implantaten en optreden van antilichamen. Daarom zijn wij geneigd de transplantatieantigenen die deze immunologische reactie veroorzaakten in de heterologe cellen te localiseren.

Gegevens omtrent de localisatie van antigeen in heterologe implantaten vonden wij bij de volgende auteurs.

Makinodan, Gengozian en Albricht (1958) toonden de antigenen, verantwoordelijk voor immuniteit bij transplantatie van heteroloog beenmerg, uitsluitend aan in de kernhoudende cellen en gelocaliseerd in de kernen, de mitochondrien en de microsomen. In serum en rode bloedcellen van de

donor vonden zij geen transplantatieantigenen. Zij gingen de invloed na van vooraf gegane sensibilisatie met de verschillende onderzochte stoffen op de overlevingstijd van muizen, die na röntgenbestraling behandeld werden met rattenbeenmerg.

Millonig Amrein en Borman (1962) spoten konijnen 24 weken elke week in met gemalen runderbot waaraan compleet Freunds Adjuvans was toegevoegd. 10 Dagen na de laatste injectie werd bloed afgenomen en serum gewonnen. Zij konden antilichamen aantonen tegen runderserum, rundererytrocyten en een extract van runderbot, bereid volgens Bonfiglio (1955). Ook na adsorptie met runderserum en rundererythrocyten bleken er nog antilichamen tegen het botextract aanwezig. Het geadsorbeerde serum toonde bij electrophorese nog zwakke praecipitaatlijnen. Het extract bevatte dus nog zeker twee antigenen, die niet identiek zijn met de antigenen uit serum en erythrocyten en die aan de sensibilisatie van de proefdieren hebben bijgedragen.

Wij moeten ook rekening houden met de mogelijkheid, dat de tussenstof antigeen werkzame stoffen bevat, die niet in het door ons gebruikte thymusextract voorkomen. In aanmerking komt dan vooral het collageen in deze tussenstof. Bestudering van de antigene werking door collageen is dus nodig. Hierover vonden wij in de literatuur de volgende gegevens.

Watson, Rothbard en Venamee (1954) en Paz, Davidson, Gomez en Mancini (1963) toonden met behulp van complement-bindingsreacties antigene werking aan van verschillende collageenextracten bereid uit peesweefsel.

Maurer (1954) kon konijnen immuniseren tegen gelatine.

Peacock (1960) kon echter na implanteren van peesweefsel geen antilichamen aantonen met behulp van de complement-binding en vond ook geen vervroegd afstoten van huidtransplantaten bij homologe transplantatie na voorafgaande peesweefsel transplantatie. Hij meent, dat „solid collagen" zó langzaam wordt afgebroken, dat het geen aantoonbare antigene werking uitoefent.

Alleen Makinodan en zijn medewerkers toonden dus zeker transplantatieantigenen aan bij heterologe transplantatie en localiseerden deze in de kernhoudende cellen. Antigene werking van collagene vezels is volgens Peacock onwaarschijnlijk en de antigene werking van collageenextracten is volgens de andere aangehaalde schrijvers wel aanwezig, maar gering.

Opgemerkt kan nog worden, dat Makinodan geen transplantatieanti-

genen in de erythrocyten en het bloedserum aantoonde. Onze waarneming dat bovine albumine in onze testmethode niet als antigeen werkzaam bleek te zijn klopt met deze waarneming.

De conclusie lijkt ons gewettigd, dat bij hetero-transplantatie de transplantatieantigenen gelocaliseerd zijn in de kernhoudende cellen. Wij kunnen hier verband leggen met de door ons gevonden betekenis van de cellulaire elementen in de implantaten voor de weefselreactie van de gastheer.

Kan er een causaal verband gelegd worden tussen de histologische en de immunologische waarnemingen bij implantatie van D.V.-bot?

Op de 7e dag na implantatie vonden wij zowel de vorming van een sterke ontstekingswal om de implantaten als sensibilisatie van de proefdieren met aantoonbaar zijn van circulerende antilichamen. Ook op de 10e dag zijn deze beide verschijnselen naast elkaar aanwezig.

Dit samengaan in de tijd bewijst uiteraard niet, dat antigenen uit de implantaten en antilichamen, gevormd door het proefdier, oorzaak zijn van de histologische reactie. Mogelijk oefenen bepaalde stoffen uit de implantaten een directe toxische werking uit op de omgevende weefsels en veroorzaken zo de reactie. Het lijkt ons dan echter moeilijk verklaarbaar, dat er op de 4e dag, wanneer er zeker goed contact tussen de implantaat- en gastheerweefselvochten is opgetreden, van een dergelijke reactie nog niets te merken is, terwijl er op de 7e dag, wanneer er van binnendringen van gastheerweefsel in de D.V.-bot implantaten nog nauwelijks sprake is, de weefselreactie juist aanwezig en maximaal is. Deze feiten zijn gemakkelijker te verklaren, wanneer men aanneemt, dat de hypothetische stof die de reactie veroorzaakt, op indirecte wijze werkzaam is via een algemene of plaatselijke verandering van het proefdier.

De physische eigenschappen van de hare bottussenstof in de vorm van spongieus bot leveren evenmin een verklaring voor het optreden van de weefselreactie bij het D.V.-bot. Het H_2O_2-bot gaf immers bij voldoende zuivering geen weefselreactie. Ook ontbrak dan antilichaamproduktie in aantoonbare graad. Hier dient vermeld te worden, dat Anderson en medewerkers (1961) een belangrijke invloed van de vorm waarin het botweefsel ingeplant werd, op de opgewekte ontstekingsreactie meenden te kunnen constateren. Fijn gemalen botweefsel, werwerkt tot een pasta, veroorzaakte een sterkere ontstekingsreactie dan blokjes botweefsel. Wij

hebben bij een aantal proefdieren zaagsel van H_2O_2-bot geïmplanteerd. In al onze gevallen zagen wij na een proefduur van 7 en 10 dagen dezelfde beelden als bij H_2O_2-bot pastilles. Mogelijk zijn de waarnemingen van Anderson te verklaren, doordat de beenmerg elementen, die in zijn pasta ook mee verwekt werden, in deze vorm voor de gastheer gemakkelijk bereikbaar waren.

Een immunologische oorzaak van de weefselreactie op D.V.-bot implantaten lijkt ons de meest bevredigende hypothese. Hoe kunnen wij ons de invloed van antigeen in het implantaat en antilichaam in de gastheer op deze histologische gastheerreactie voorstellen? Men kan hierbij denken, óf aan beïnvloeding van de gastheerweefsels door de inwerking van antilichaam op vrij antigeen, óf aan gevoelig maken van de gastheerweefsels voor vrij antigeen door de aanwezige antilichamen, die zich aan de cellen gehecht hebben. In het laatste geval zou het mechanisme overeenkomen met dat, wat Ovary aanneemt voor de P.C.A.-reactie.

Echter, de walreactie verdwijnt tussen de 10e en 14e dag na implantatie, maar het antilichaamgehalte van het bloed neemt in die periode nog toe. Het beeld van de D.V.-bot implantaten na 14 dagen implantatieduur toont echter, niet alleen dat de ontstekingswal nu ontbreekt, maar bovendien dat het dode beenmerg uit de implantaten vrijwel steeds volledig is opgeruimd. Het is daarom aannemelijk, dat het antigeen-aanbod door de implantaten op dit tijdstip sterk gedaald is. Het verdwijnen van de walreactie kan dan verklaard worden uit een daling van het antigeenaanbod beneden een critische waarde. De productie van antilichaam door de geactiveerde weefsels, vermoedelijk de lymphklieren, gaat echter voorlopig nog door. Wij voelen het als een tekortkoming van dit onderzoek, dat de sensibilisatie van de proefdieren bij langere duur van de implantatie niet werd nagegaan. Bij een aantal dieren kon echter 70 dagen na implantatie van D.V.-bot de A.C.A.-reactie verricht worden. Deze bleek nog steeds positief uit te vallen.

Een analogie met de hier gegeven opvatting omtrent sensibilisatie, het optreden van antilichamen en de betekenis van antilichamen en antigeen voor de weefselreactie bij heterologe weefselimplantaten, vonden wij in de onderzoekingen van Heslop, Nisbet, en Zeiss over transplantatie van autoloog en homoloog levend botweefsel naar een subcutane, dus heterotope, plaats bij ratten.

Heslop en medewerksters vonden bij homologe transplantatie een bindweefselreactie met op de 3e dagna implantatie optreden van grote mononucleaire cellen en enkele fibroblasten, daarna een sterkere fibro-

blasten reactie, en op de 7e dag rijper bindweefsel met lymphocyten en plasmacellen. Dit hele reactiepatroon vatten zij op als behorend tot de „homograft reaction" waardoor dit begrip dus ruimer genomen wordt dan gewoonlijk. (Heslop en medewerkers 1960). Het bleek hun nu, dat deze „homograft reaction" volledig uitbleef bij dieren, die door injectie van isologe miltcellen van de donorstam vlak na de geboorte, tolerant gemaakt waren voor weefsel van deze stam. De „homograft reaction" zoals zij die opvatten en die zeer veel overeenkomst met onze „heterograft reaction" vertoont, blijkt dus volledig te berusten op een proces, waarbij antigeen en antilichaam betrokken moeten zijn (Nisbet, Heslop en Zeiss 1960).

Conclusies

Gekomen aan het einde van ons onderzoek menen wij nu de in het eerste hoofdstuk gestelde vragen als volgt te kunnen beantwoorden.

1. De histologische reactie op implantatie van door bevriezen geconserveerd spongieus kalfsbot verschilt bij de cavia duidelijk en constant van de reactie op kalfsbot, dat gemacereerd werd volgens de methode aangegeven door Bauermeister.

Bij een proefduur van 7 en 10 dagen wordt om geconserveerd kalfsbot een ontstekingswal gevormd, bij een proefduur van 14 en 21 dagen vindt in deze implantaten een invasie van rondkernigen en plasmacellen plaats.

Deze beide reactievormen ontbreken bij volledig van mergweefsel en osteocyten gezuiverde implantaten.

2. Implantatie van geconserveerd kalfsbot veroorzaakt bij de cavia sensibilisatie en geeft aanleiding tot vorming van antilichamen, die zowel in de weefsels als in het bloedserum vanaf de 7e dag kunnen worden aangetoond. Deze antilichamen passen op antigenen die in een waterig extract van kalfsthymus weefsel voorkomen.

Spongieus kalfsbotweefsel dat volledig van mergweefsel en osteocyten gezuiverd is veroorzaakt geen sensibilisatie, die op deze wijze aangetoond kan worden.

3. Zowel de kenmerkende weefselreactie als de sensibilisatie treden alleen op wanneer cellulair kalfsweefselmateriaal in de implantaten aanwezig is.

4. Een onvoldoende zuivering van de H_2O_2-bot implantaten veroorzaakt wel aantoonbare sensibilisatie, maar slechts geringe weefselreactie.

Op grond van deze uitkomsten en van de in dit hoofdstuk gegeven beschouwingen is het o.i. zeer aannemelijk, dat de histologische reactie om en in de D.V.-bot implantaten immunologisch bepaald wordt en berust op het gelijktijdig in de weefsels voorkomen van antigeen uit de implantaten en antilichaam tegen dit antigeen. *Deze histologische reactie is daarom op te vatten als een hetero-implantaatreactie.*

De bewerking van heteroloog spongieus botweefsel volgens de methode aangegeven door Bauermeister, blijkt de antigene werking van de implantaten te kunnen opheffen en daarmee het optreden van de hetero-implantaat-reactie te voorkomen.

Het is, door de grote overeenkomst tussen de histologische reactie op geconserveerd autoloog botweefsel (Hfdst. II) en die op goed gezuiverde heterologe botsubstantie, zeer waarschijnlijk dat de elementen van de botsubstantie niet werkzaam zijn als transplantatie antigenen.

Men mag verwachten dat ook de menselijke weefsels heteroloog H_2O_2-bot zullen accepteren zonder afweerreactie. Of deze botimplantaten een bevorderende rol kunnen spelen bij de genezing van een botwond, zelfs in dit opzicht haast gelijkwaardig zijn aan verse autologe transplantaten zoals Bauermeister meent te kunnen aantonen, is een probleem waarop ons onderzoek geen licht kan werpen. Wij willen er tot slot, waarschijnlijk ten overvloede, op wijzen dat het ontbreken van schadelijke factoren niet gelijkgesteld mag worden aan het aanwezig zijn van goede eigenschappen van een implantaat of transplantaat. Het H_2O_2-bot zou zeer goed kunnen blijken neutraal te zijn.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven naar de weefselreactie die door subcutane implantatie van volgens de methode Bauermeister (1958) gemacereerd, spongieus kalfsbot bij de cavia veroorzaakt wordt. De reactie op dit gemacereerde, heterologe bot wordt vergeleken met die op spongieus kalfsbot en autoloog bot, beide geconserveerd door bevriezing. Vervolgens wordt onderzocht welke component in het geconserveerde, heterologe bot de kenmerkende weefselreacties veroorzaakt. Nadat is aangetoond, dat het geconserveerde heterologe bot het optreden van antilichamen tegen antigeen in een extract van kalfsthymusweefsel veroorzaakt, wordt aannemelijk gemaakt dat de weefselreactie op geconserveerd, heteroloog botweefsel een immunologisch bepaalde hetero-implantaatreactie is. De toegepaste maceratiemethode blijkt deze antigene werking van heteroloog botweefsel te kunnen opheffen.

In hoofdstuk I worden de verschillende vormen, waarin homologe en heterologe botimplantatenonderzocht en gebruikt zijn, en de rol die een botimplantaat bij de genezing van een botdefect zou kunnen spelen, kort besproken. De oudere maceratiemethoden bleken een product op te leveren, dat in experimentele en klinische situatie veel minder bruikbaar is dan andere implantaatsoorten. Bauermeister ontwikkelde een nieuwe maceratiemethode en vond in dierproeven, dat op deze wijze gemacereerd botweefsel geen afweerreactie van de gastheer opwekt en de botvorming bevordert. Deze onderzoeker meent dat de afweerreactie ontbreekt doordat het gemacereerde bot geen antigenen bevat.

In hoofdstuk II worden implantatieproeven bij cavia's beschreven met geconserveerd of gemacereerd spongieus kalfsbot en met geconserveerd autoloog caviabot. Heterologe botimplantaten van een standaardafmeting werden in de weefsellaag direct onder de huidspier aangebracht.

Op de 2e en 4e dag na de implantatie was de weefselreactie om beide vormen van heteroloog bot gering en werden er geen duidelijke verschillen gevonden.

Bij een proefduur van 7, 10, 14 en 21 dagen werden er constante en duidelijke verschillen gevonden in de weefselreactie op de beide heterologe implantaatsoorten.

Om het geconserveerde, heterologe bot werd op de 7e en 10e dag een wal van ontstekingsweefsel gevonden, de walreactie. Op de 14e en 21e dag waren deze implantaten omgeven door een dunne fibreuze kapsel en bleek het gastheerweefsel om en in de implantaten geïnfiltreerd met rondkernigen waarbij vele plasmacellen. Het dode beenmerg van de implantaten was eerst na 14 dagen vervangen door vaatrijk en vrij vezelrijk bindweefsel.

Gemacereerd, heteroloog botweefsel werd snel doorgroeid met vaatrijk gastheerweefsel. Er traden geen walreactie en geen infiltratie met rondkernigen en plasmacellen op.

Beide implantaatsoorten veroorzaakten een sterke reuzencelreactie. Deze reuzencellen zagen wij bij de implantaten van geconserveerd bot vrijwel uitsluitend bij, door de bewerking ontstane, brokjes botsubstantie. Bij de gemacereerde implantaten lagen de reuzencellen ook tegen botbalkjes die onbeschadigd leken.

De reactie op geconserveerd autoloog botweefsel was vrijwel als die op gemacereerd, heteroloog weefsel. De vervanging van het geconserveerde merg door jong gastheerweefsel geschiedde even snel als het binnendringen van dit weefsel in de lege ruimte tussen de balkjes in het gemacereerde bot. De reuzencelreactie was echter beduidend geringer en men vindt deze cellen in de onderzochte stadia vrijwel uitsluitend aan de periferie van het implantaat.

Na 60 en 120 dagen was de weefselreactie op de heterologe implantaatsoorten weer vrijwel gelijk en toonden beide een geringe plasmacelinfiltratie. De gemacereerde implantaten bleken sneller geresorbeerd te worden dan de geconserveerde.

Deze waarnemingen wekten de indruk dat de maceratie het heterologe botweefsel zo veranderd heeft dat de reactie van het gastheerweefsel gelijk wordt aan die op gedood, maar geconserveerd, autoloog botweefsel. De versterkte reuzencelreactie bij het gemacereerde bot is ons inziens een aanwijzing er voor, dat de maceratie de tussenstof toch aantast. De sneller optredende resorptie van dit bot wijst hier eveneens op.

In hoofdstuk III is onderzocht welke component van het geconserveerde spongieuse kalfsbotweefsel de voor dit weefsel kenmerkende reactie veroorzaakt. Het kalfsbotweefsel werd hierbij opgebouwd gedacht uit bottussenstof, vetweefsel en cellulaire beenmergelementen. Nagegaan werd de weefselreactie op de volgende implantatiematerialen: ontvet geconserveerd kalfsbot; kalfsvet dat van weefselelementen ge-

zuiverd is; geconserveerd kalfsthymusweefsel; gemacereerd kalfsbot waaraan geconserveerd kalfsthymusweefsel is toegevoegd. In deze experimenten bleek zowel het optreden van de granulatiewal om de implantaten als de infiltratie er van met rondkernigen en plasmacellen, alleen voor te komen wanneer cellulair kalfsmateriaal aanwezig is.

In hoofdstuk IV wordt het onderzoek beschreven naar sensibilisatie van de proefdieren door de implantaten. Hier wordt gebruik gemaakt van de aktieve en passieve huidanaphylaxiereactie (Ovary). Nadat de onderzoekmethode beschreven is wordt eerst aangetoond dat na eenmalige implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel en van geconserveerd, spongieus kalfsbot, antilichamen gevormd worden tegen antigeen dat ook in kalfsthymus aanwezig is. Deze antilichamen bleken zowel in de huid als in de circulatie aantoonbaar. In de verdere proeven bleek implantatie van geconserveerd spongieus kalfsbot steeds sensibilisatie te veroorzaken. De aktieve huidanaphylaxiereactie was op de 7e dag na implantatie positief en nam in sterkte toe tot de 21e dag. De sterk positieve passieve huidanaphylaxiereactie met serum van deze proefdieren toonde aan dat ook circulerende antilichamen aanwezig zijn.

Na implantatie van geconserveerd autoloog botweefsel waren de A.C.A.-reacties steeds negatief.

Het gemacereerde kalfsbot dat aanvankelijk bij deze proeven gebruikt werd, sensibiliseerde de proefdieren. De A.C.A.-reactie werd op de 10e dag positief, de P.C.A.-reactie op de 14e dag. De waarden bleven beneden die, gevonden na implantatie van geconserveerd kalfsbot. Histologisch onderzoek van de implantaten met hun omgeving en proeven met hetzelfde gemacereerde bot nadat dit nogmaals gezuiverd was met behulp van H_2O_2-oplossing, maken het aannemelijk dat deze sensibilisatie door het gemacereerde bot toegeschreven moet worden aan een onvolledige maceratie. De implantaten bleken niet geheel van heteroloog cellulair materiaal ontdaan te zijn geweest.

In hoofdstuk V worden de uitkomsten der experimenten en de daaruit getrokken conclusies samengevat en aan de hand van de geraadpleegde literatuur kritisch beschouwd. De oorzaak van de walreactie om implantaten van geconserveerd spongieus kalfsbot wordt gezocht in de sensibilisatie van de proefdieren en het daardoor samen in de weefsels voorkomen van antigeen en antilichaam. Het verdwijnen van deze walreactie tussen de 10e en de 14e dag na implantatie wordt toegeschreven aan vermindering van aanbod van antigeen door het implantaat.

De histologische reactie van de gastheer op dit geconserveerde

spongieuse kalfsbot wordt daarom beschouwd als een hetero-implantaatreactie. Het antigeen in deze implantaten is zeker grotendeels gelocaliseerd in de kernhoudende cellen van het geconserveerde beenmerg en in de geconserveerde osteocyten. Maceratie op de manier die door Bauermeister werd aangegeven, blijkt deze antigeendragende cellen volledig uit het botweefsel te kunnen verwijderen zonder de botsubstantie in belangrijke mate aan te tasten.

De histologische reactie op deze volledig gemacereerde botsubstantie komt vrijwel overeen met die op geconserveerd autoloog botmateriaal.

Het is hierdoor niet waarschijnlijk dat stoffen uit de botsubstantie, ook al zouden die als antigeen werkzaam kunnen zijn, een belangrijke invloed hebben bij de weefselreactie die door heterologe botimplantaten veroorzaakt worden.

Is de maceratie onvolledig, zodat geringe resten van de kernhoudende cellen in het maceratieproduct achterblijven, dan kunnen dergelijke implantaten reeds een sensibiliserende werking uitoefenen. Ook de histologische hetero-implantaatreactie blijkt dan, zij het in geringe mate, op te treden.

De door ons in proef 7, pag. 49 aangegeven zeer gevoelige onderzoekmethode naar sensibiliserende werking van heteroloog botweefsel is bruikbaar om na te gaan of een gegeven maceratiemethode een product levert dat vrij is van transplantatie-antigeen.

Wij achten het zeer aannemelijk dat de beschreven hetero-transplantaatreactie de bruikbaarheid voor transplantatiedoeleinden van geconserveerd heteroloog botweefsel ongunstig zal beïnvloeden. Hoewel volgens de methode Bauermeister gemacereerd bot, dat deze reactie niet opwekt, daarom meer kans op succes lijkt te bieden, mag ons inziens uit het ontbreken van deze ongunstige invloed alleen niet tot klinische bruikbaarheid van dit gemacereerde botweefsel geconcludeerd worden. Verder experimenteel onderzoek, waarbij gemacereerd heteroloog bot met levend autoloog bot vergeleken wordt bij transplantatie naar botvormend milieu, en eventuele nauwkeurig geobserveerde klinische toepassing zullen nodig zijn voor tot klinische toepassing van dit botimplantaat geadviseerd kan worden. De tot nu toe in de literatuur meegedeelde ervaringen met dit botmaceraat geven hieromtrent ons inziens nog onvoldoende inlichting.

SUMMARY

This thesis deals with an investigation into the tissue reaction to the subcutaneous implantation in the guinea pig of heterogenous processed bone prepared according to Bauermeister (1958). This reaction was compared with the reaction to complete frozen cancellous calf bone and autogenous bone. An attempt was also made to determine which component of the frozen heterogenous bone is responsible for the tissue reaction characteristic for this bone. Evidence is presented that the tissue response to frozen cancellous calf bone is a heterograft reaction caused by an immunological mechanism. It was found that the method used to prepare the calf bone eliminated the antigenic stimulus responsible for the reaction.

Chapter I gives a brief discussion of the forms in which homogenous and heterogenous bone implants are investigated and used clinically, as well as their application in the treatment of skeletal lesions. Bone prepared by earlier methods has been found less satisfactory for experimental and clinical use than other types of implants. The method developed and later tested in animals by Bauermeister was found by him to induce no negative reactions in the host and to promote bone formation. In his opinion this positive reaction is due to the fact that material prepared according to his method is free of antigens.

Chapter II describes implantation experiments in guinea pigs with both frozen and processed calf bone grafts from a single animal. A series of control animals received frozen autogenous bone grafts. Heterogenous grafts of uniform size were implanted in the tissue layer just underneath the skin muscle. The grafts were studied histologically 2, 4, 7, 10, 14, 21, 60, and 120 days after implantation.

On the 2nd and 4th day the tissue reaction to both types of heterogenous grafts was slight and very similar. After 7, 10, 14, and 21 days, constant and distinct differences were found between the two types of graft.

On the 7th and 10th day the host tissue was found to have formed a wall of granulation tissue around the graft. This wall contained many

minute vessels, granulocytes, and histiocytes. On the 14th and 21st day the implants were surrounded by a thin layer of fibrous tissue and the host tissue in and around the implants had been infiltrated by round cells and numerous plasma cells. The host tissue invaded the grafts rather slowly, penetration being virtually completed at 14 days.

The processed grafts, on the other hand, had been completely invaded after 7 days by a loose connective tissue containing many small vessels. No wall of granulation tissue was seen on either the 7th or 10th day, and no infiltration of plasma cells or round cells was observed on the 14th or 21st day.

Both types of graft showed numerous multinucleated giant cells; in the frozen implants these giant cells were found almost exclusively adjacent to small particles of intercellular substance and in the processed implants they lay flattened out against the well-preserved trabeculae.

The reaction to frozen autogenous and processed heterogenous grafts was very similar. The dead marrow tissue failed to form an obstacle to the penetration of the graft by the host tissue, no wall formation was found around the grafts, and no invasion by round cells was seen. Multinucleated cells were found in smaller numbers and were located peripherally where the grafts had been injured by the process of preparation.

On the 60th and 120th day both types of heterogenous grafts showed some plasma cells and the same general response. The processed grafts were resorbed more rapidly than the frozen implants, and after 120 days remnants of only 2 specimens were found, the other 4 having completely disappeared.

These observations give the impression that the heterogenous bone had been changed by the process of preparation in such a way that the reaction of the host tissue was the same as that to frozen autogenous bone. The incidence of the giant cells and the increased rate of resorption in processed grafts may be considered to indicate that intercellular substance changes during preparation.

Chapter III is devoted to a study of the component of the frozen cancellous bone grafts responsible for the characteristic response of the host tissue. The calf bone is considered to be composed of intercellular substance, fat tissue, and cellular marrow elements. The study was carried out in defatted frozen calf bone, calf fat tissue, processed calf bone saturated with fat, calf fat freed of tissue elements, frozen calf thymus, and processed calf bone to which frozen thymus tissue had been added.

Although the number of experiments was rather small, the results indicate that both the formation of the granulation wall around the implant and infiltration of the implant by round cells and plasma cells occur only in the presence of a sufficient amount of cellular material.

Chapter IV describes antibody formation in guinea pigs implanted with frozen calf thymus, frozen cancellous calf bone, processed cancellous bone, and frozen autogenous bone. Active and passive cutaneous anaphylaxis (Ovary) were used to demonstrate antibody to antigen in an aqueous extract of calf thymus. The method is described. The implantation of frozen calf thymus and frozen cancellous bone consistently caused antibody formation in the guinea pig, the antibodies being demonstrable in both the skin and the blood. A.C.A. and P.C.A. were both positive on the 7th day, and the animals reacted more strongly by the 10th day. Subsequently, there was a slight rise which continued up to the 21st day, the last day studied. A positive P.C.A. proved the presence of circulating antibodies.

After implantation of frozen autogenous bone tissue the A.C.A.-test gave consistently negative results.

Neither processed calf bone nor frozen autogenous bone caused antibody formation which could be demonstrated by the methods employed. When the processing had left small remnants of bone marrow or osteocytes, antibodies could be demonstrated, but both the P.C.A. and the A.C.A. were significantly weaker than those caused by frozen bone.

Chapter V contains a review of the literature on heterotransplants, and a discussion of our findings. It is suggested that the wall found around frozen heterografts on the 7th and 10th day is caused by interaction of antigen and antibody at the site of implantation, the disappearance of this phenomenon between the 10th and 14th day corresponding to the replacement of the heterogenous bone-marrow tissue by host tissue.

The histological response of the host tissue to frozen heterogenous bone is therefore considered to be a heterograft reaction, the antigen being located in the nucleated cells in the implants. The method according to Bauermeister removes these cells and the antigenic stimulus from heterogenous bone, leaving the bone substance substantially unaffected. Since the host tissue response to processed bone and frozen autogenous bone shows a high degree of similarity, it seems improbable that the intercellular substance of bone contains antigens capable of influencing the heterograft host tissue reaction.

Chapter IV, experiment number 7, contains a description of a practical

and highly sensitive method for testing procedures for processing heterogenous bone for its capacity to produce implantation material free of tissue antigens.

Although in these experiments processed heterogenous bone compares favourably with frozen autogenous bone, these studies provide no basis on which to draw conclusions concerning the suitability of this material for clinical use.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

ANDERSON, K. J., J. SCHMIDT, J. F. LECOCQ. 1959. The effect of particle size of the heterogenous bone transplant on the host tissue: I vascular penetration. J. Bone and Joint Surg. 41 A: 1455.

ANDERSON, K. J., J. A. DINGWALL, J. SCHMIDT, J. F. LECOCQ, P. K. CLAWSON, 1961. The effect of particle size of the heterogenous bone transplant on the host tissue II A histological study. J. Bone and Joint Surg. 43 A: 996.

BARBIERI, E., 1959. Fattori immuno-biologici nella evoluzione degli eterotrapianti ossei. Archivio di ortopedia, 72: 442.

BASSETT, C. A. L., D. K. Creighton jr., 1962. A comparison of host response to cortical autografts and processed calf heterografts. J. Bone and Joint Surg., 44 A: 842.

BASSETT, C. A. L., L. A. HURLEY, F. E. STINCHFIELD, 1962. The fate of long-term anorganic bone implants. Transpl. Bull., 29: 51.

BAUERMEISTER, A., 1958. Experimentelle Grundlagen fur den Aufbau einer neuen Knochenbank. Hefte zur Unfallheilkunde, 58.

BAUERMEISTER, A., 1960. Entwicklung, Herstellung, Leistung des Kieler eiweissarmen Tierknochenspanes. Bull. de la Société internationale de Chirurgie, 19: 612.

BERG, A., 1948. Contribution to the technique in fusion operations on the spine. Acta Orthop. Scand., 17: 1-30.

BONFIGLIO, M., W. S. JETER, C. L. SMITH, 1955. The immune concept: its relation to bone transplantation. Ann. N. York Academy of Sciences, 59: 417.

CHESTERMAN, F. C., L. M. FRANKS, 1960. Heterotransplantation and organ culture of human embryonic lung. J. Path. and Bact., 79: 123.

CRAIGMYLE, M. B. L., 1958. Regional lymph node changes induced by cartilage homo- and heterografts in the rabbit. J. of Anat. 92: 74.

CURTISS, P. H., C. H. HERNDON, 1955. Immunologic factors in homogenous bone transplantation. I serological studies. Ann. N. York Academy of Sciences, 59: 434.

VAN DUYN, P., J. OORT, 1962. Stirring during freeze substitution. Stain Technology, 37: 116.

FEINBERG, J. G., J. M. DEWDNEY, 1962. Use of a non-persisting dye for demonstrating local anaphylaxis. Nature, 194: 199.

FLEISHER, M. S., 1918, Immunity and tissue transplantation I. The reactions occuring about tissue transplanted into heterologous animals. J. Med. Research, 37: 483.

GRESHAM, R. B., E. D. THOMAS, 1962. A comparative histologic study of the early phases of transplanted bone autografts, freeze-dried homografts and processed calf heterografts. Surgical Forum, 13: 452.

GUILLEMINET, M., P. STAGNARA, T. DUBOST-PERRET, 1953. Preparation and use of heterogenous bone grafts. J. Bone and Joint Surg. 35 B: 561-567.
GUILLEMINET, M., P. STAGNARA, SCHNEPP, R. BARONE, F. VALENTIN, A. LARCHER, 1957. La cryodessication des os de banque. Revue de Chirurgie Orthopédique, 43: 451-465.

HAASCH, K., 1961. Metaplastische Knochenbildung beim Menschen durch heterogene eiweissarme Spongiosa. Der Chirurg, 32: 183.
HANCOX, N., in BOURNE, G. H., 1956. The biochemistry and physiology of bone. Academic Press Inc. N. York.
HANCOX, N., R. OWEN, A. SINGLETON, 1961. Cross-species grafts of deproteinized bone. J. Bone and Joint Surg., 43 B: 152.
HASKOVA, V., J. CHUTNA, M. HASEK, J. HORT, 1962. Destruction of tolerated skin heterografts by means of serum antibodies and the role of antibodies in graft rejection. Ann. N. York Academy of Sciences, 99: 602.
HESLOP, B. F., I. M. ZEISS, N. W. NISBET, 1960. Studies on transference of bone. I. Comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. Brit. J. of Exp. pathology, 41; 269.
HURLEY, L. A., F. G. ZEIER, F. E. STINCHFIELD, 1960. Anorganic bone grafting. American J. Surg., 100; 12.

JUDET, J., R. JUDET, 1954. Banque d'os. Revue de Chirurgie Orthopédique, 40; 403.

KIENHOLTS, M., B. KEMKES, 1956. Untersuchungen über den immunbiologischen Wert heteroplastischer konservierter Knochenspäne. Arch. Orthop. Unfall-Chir., 48: 623.
KINGMA, M. J., 1960. Results of transplantations with preserved calf bone. Arch. Chir. Neerlandicum, 12: 221.
KOSKI, K., A. L. LAAKSONEN, E. LUOSTARINEN, 1962. Heterologous human foetal bone transplants. Ann. Medicinae Experimentatis et Biologiae Fenniae, 40: 318.
KÜPPERMANN, W., 1960. Erfahrungen bei der Fixierung von Frakturen mit homoplastischen und heteroplastischen Knochen. Bull. de la Société internationale de Chirurgie, 19: 664.

LACROIX, P., The Organization of Bones. 1951. The Blakiston Co. Philadelphia.
LENTZ, W., 1955. Die Grundlagen der Transplantation von fremden Knochengewebe. G. Thieme, Stuttgart.
LEVANDER, G., 1946. Alcohol soluble ostegenetic substance from bone marraw. Nature, 157; 587.
LOEB, L., J. S. HARTER, 1926. Heterotransplantation of cartilage and fat tissue and the reaction against heterotransplants in general. The Amer. J. Pathol., 2: 521.
LOSEE, F. L., L. A. HURLEY, 1956. Bone treated with ethylenediamine as a succesfull foundation material in cross-specias bone grafts. Nature, 177: 1032.

MAATZ, R., W. LENTZ, R. GRAF, 1953. Experimentelle Grundlagen der Transplantation konservierter Knochen. Deutsche Ztsch. f. chirurgie, 173: 850.
MAKINODAN, T., N. Gengozian, J. F. ALBRIGHT, 1958. Antigens responsable for bone marrow transplantation immunity. Ann. N. York Academy Sciences 73: 757.

MATTI, H., 1932. Über freie Transplantation von Knochenspongiosa. Arch. f. klin. Chir., 168: 236-258.
MAURER, P.H., 1954. Antigenicity of gelatin in rabbits and other species. J. Exp. Med., 100: 515.
MELCHER, A. H., J. T. IRVING, 1963. The effect of implanting various substances in artificially created circumscribed defects in rat femurs. J. Bone and Joint Surg., 45 B: 162-175.
MILLONIG, R. C., B. I. AMREIN, A. BORMAN, 1962., Antigenicity of bovine cortical bone. Proc. Soc. Experimental Biology and Medicine, 109: 562.
MOSS, M. L., 1962. Studies of the acellular bone of teleost fish. III intraskeletal heterografts in the rat. Acta Anatomica, 49: 266.
MOWLEM, A. R., 1945. Cancellous chip grafts for the restoration of bone defects. Proc. Roy. Soc. Med., 38: 171-174.

NISBET, N. W., B. F. HESLOP, I. M. ZEISS, 1960. Studies on transference of bone. III manifestation of immunological tolerance to implants of homologous cortical bone in rats. Brit. J. Exp. Pathology, 41: 443.

OVARY, Z., 1958. Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen interaction. Progress in Allergy V: 459. Karger-Basel/N. York.
OVARY, Z., 1964. in: Immunological methods, blz. 276. BLACKWELL. Scientific publ. Oxford.

PAZ, M. A., O. W. DAVIDSON, C. J. GOMEZ, C. F. MANCINI, 1963. Formation of collagen I, antigenicity of collagen fractions. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 113: 98.
PEACOCK, E. E., 1959. Morphology of homologous and heterologous tendon grafts. Surg. Gyn. and Obstet, 10.
PEACOCK, E. E., 1960. Homologous composite tissue grafts of the digital flexor mechanism in human beings. Transpl. Bull, 7 (25): 418.

SIEGRIST, W. H., W. F. ENNEKING, 1961. Histological aspects of heterogenous bone transplantation. Transpl. Bull., 27: 437.
STAGNARA, P., T. DUBOST-PERRET, 1950. Greffes osseuses. Transplants homogênes et heterogênes. Revue de Chirurgie Orthopédique, 36: 404-416.

WATSON, R. F., S. ROTHBARD, P. VANAMEE, 1954. The antigenicity of rat collagen. J. Exper. Med., 99: 535.
WILLIAMS, J. B., J.W. Irvine, 1954. Preparation of the inorganic matrix of bone. Science, 119: 771.

AANHANGSEL

Ontvetten van diepgevroren kalfsbot.

De pastilles D.V.-bot, bewaard bij —20° C., worden ontdooid, daarna stuk voor stuk snel bevroren in een mengsel van aceton en koolzuursneeuw en vervolgens in glazen buisjes, gevuld met een mengsel van aethanol-aether 1 : 1, die gedurende 10 minuten in koolzuursneeuw gekoeld zijn, gebracht. De flesjes worden met een ingeslepen glazen stop afgesloten en direct in het vriessubstitutieapparaat geplaatst.

Na 24 uur wordt in alle buisjes de aethanol-aether ververst. Na 2 × 24 uur wordt de aethanol-aether vervangen door zuivere aether, die daarna om de 2 dagen ververst wordt. Bij elke verversing wordt nu 1 implantaat op vet onderzocht door kleuring van een vriescoupe met Soedan III.

Op de 8e dag was deze kleuring negatief. Op de 10e dag werden de implantaten uit de uitwisselaar genomen. De aether werd afgeschonken en de beenschijfjes werden steriel bewaard bij —20° C.

Bereiding van celvrij kalfsvet.

Kalfsvetweefsel afkomstig van een normale abattoir-slachting wordt direct bij een temperatuur van —20° C. geplaatst, tot verdere bewerking volgen kan.

Een stuk vetweefsel wordt ontdooid, klein geknipt en, met aether gemengd, in het apparaat volgens Bühler onder waterkoeling fijn gemalen. Het mengsel wordt door een grove zeef gezeefd. De vloeistof wordt 3 uur geschud in een Erlemeyer kolf, die afgesloten is met rubber stop. Affiltreren door filtreerpapier. Aan het troebele filtraat wordt aether toegevoegd, tot de vloeistof helder is. Na 24 uur staan bij kamer-temperatuur wordt de oplossing door een Seitsfilter getrokken en steriel opgevangen. Daarna wordt de vloeistof in verschillende porties in steriele Petrischaaltjes, afgesloten met deksel, in de exsiccator geplaatst en de aetherdamp afgezogen.

Bereiding extract van kalfsthymusweefsel.

A-gram kalfsthymusweefsel wordt met A-gram physiologisch zout gemalen in het apparaat volgens Bühler, onder koeling met ijswater. Het mengsel wordt 1 nacht bewaard in de koelkast bij 0—4° C.

De volgende ochtend wordt de brij, na filtreren door kaasdoek, gedurende 1½ uur bij 0° C. gecentrifugeerd op 20.000 toeren per minuut. De vloeistof wordt afgepipetteerd, wanneer zij nog niet geheel helder is gefiltreerd door filtreerpapier, en in kleine porties verdeeld, die bewaard worden bij —20° C.

De voor elke test nodige hoeveelheid extract wordt vlak voor gebruik ontdooid.

Tabel 1.

proef-duur	DIEPVRIES-BOT nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie	H_2O_2-BOT nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
2 dagen	16	—	—	—	19	—	—	—
„	17	—	—	—	20	—	—	—
„	18	—	—	—	21	—	—	—
„	22	—	—	—				
„	23	—	—	±				
4 dagen	16	±	—	±	19	—	—	+
„	22	±	—	—	20	—	—	++
„	23	+	—	—	21	—	—	++
7 dagen	3	++++	—	—	1	+	—	++
„	4	+++	—	±	2	±	—	++
„	11	+++	—	±	7	±	—	++
„	12	+++	—	±	8	±	—	++
„	13	+++	—	±	9	±	—	+++
„	14	+++	—	±	10	±	—	+++
10 dagen	3	++	—	++	1	—	—	++
„	4	+++	—	+	2	+	—	+++
„	11	+++	—	++	7	—	?	+++
„	12	+++	—	++	8	—	—	+++
„	13	++	—	±	9	—	?	+++
„	14	+++	—	++	10	±	—	+++

Weefselpenetratie. 0-¼ = ±; ¼-½ = +; ½-¹/₁ = ++; ¹/₁ = +++
(Halve dikte van implantaat = 1)

Tabel 1A

proef-duur	DIEPVRIES-BOT nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie	H_2O_2-BOT nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
14 dagen	3	++	++	++	1	—	—	+++
„	4	+++	±	+	2	—	—	+++
„	11	+	+++	+++	7	±	—	+++
„	12	++	++	+++	8	±	—	++
„	13	+	+	++	9	±	—	+++
„	14	++	+	+++	10	+	—	+++
21 dagen	4	++	+++	++	1	±	—	+++
„	11	+	+++	+++	2	—	±	+++
„	12	±	+++	++	7	±	±	+++
„	13	+	+++	+++	8	±	±	+++
„	14	±	+++	+++	9	+	—	+++
„	16	±	—	++	10	—	—	+++
„	22	+	+	++	19	±	—	+++
„	23	+	++	+++	20	—	—	+++
60 dagen	16	±	++	+++	19	±	+	+++
„	22	±	++	+++	20	—	++	+++
120 dagen	16	±	—	+++	19	±	+	+++
„	22	±	+	+++	20	±	±	+++
„	23	+	++	+++	28	Implantaat is geresorbeerd		
„	24	±	+	+++	30			
„	25	±	±	+++	31			
„	27	+	—	+++				

Tabel 1B

	AUTOLOOG-BOT			
proef-duur	nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
7 dagen	5	±	—	++
„	6	—	—	++
10 dagen	5	±	—	++
„	6	+	—	++
14 dagen	5	?	±	?
„	6	—	—	++
21 dagen	5	—	—	+++
„	6	—	—	+++

Tabel 2

	ONTVET D.V.-BOT				DIEPVRIES-BOT			
proef-duur	nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-pene-tratie	nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-pene-tratie
7 dg.	44	+++	—	++	44	+++	—	+
4 dg.	46	+	—	+	46	±	—	±
„	45	+++	—	+	45	+++	—	±
10 dg.	44	+++	±	++	44	++	—	+
„	45	+++	+	++	45	+++	—	+

Tabel 3

		VETWEEFSEL		
proef-duur	nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
4 dagen	40	+	—	—
„	41	—	—	—
7 dagen	40	+	—	±
„	41	±	—	±
10 dagen	41	+	—	±
15 dagen	40	+	—	±
„	41	+	±	+
21 dagen	41	±	—	++

Tabel 4

		H_2O_2-BOT + VET		
proef-duur	nummer cavia	wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
4 dagen	49	±	—	+
„	50	±	—	—
7 dagen	49	+	—	++
„	50	±	—	+++
10 dagen	49	±	—	+++
„	50	+	—	+++
14 dagen	49	—	±	+++
„	50	—	+	+++
21 dagen	49	±	+	+++
„	50	±	++	+++

Tabel 5

proef-duur	nummer cavia	THYMUS-WEEFSEL wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
4 dagen	51	+	—	—
„	52	+	—	—
7 dagen	51	+++	—	+
„	52	++	—	±
10 dagen	51	++	—	±
„	52	++	±	±
14 dagen	51		++	
„	52		++	
18 dagen	51		+	
„	52		++	

Tabel 6

proef-duur	nummer cavia	H_2O_2-BOT + THYMUS wal-reactie	plasma-cellen	weefsel-penetratie
4 dagen	47	±	—	—
„	48	±	±	—
7 dagen	47	++	—	+
„	48	++	—	±
10 dagen	47	++	—	+
„	48	++	—	++
14 dagen	47	+	+	+++
„	48	+	++	++
18 dagen	47	±	+	+++
21 dagen	48	+	++	+++

Tabel 7

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE		
		Thymus-extract × 1	B.A. 0,05 mg./cc.	Physiologisch zout
92	D.V.-bot	16	10	1
93	,,	20	5	3
98	,,	20	7	4
94	H_2O_2-bot	12	3	4
95	,,	14	3	3
96	Thymus	20	8	4
97	,,	21	6	5
99	Controle	10	2	5
100	,,	8	4	3

Resultaten van proef 2 in hoofdstuk IV. ACA-test met onverdund thymus-extract, bovine albumine oplossing 0,05 mg. per cc. en physiologisch zout, bij cavia's, 14 dagen na implantatie van respectievelijk D.V.-bot, H_2O_2-bot en geconserveerd kalfsthymusweefsel. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 8

NUMMER PROEFDIER	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE				
	Thymus-extract				Physiologisch zout
	× 1	× 10	× 25	× 50	
119	13	12	11	9	1
120	13	12	?	8	2

Resultaten van proef 3 in hoofdstuk IV. Pseudo ,,ACA-test'' bij niet gesensibiliseerde cavia's met stijgende verdunningen van thymus-extract. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 9

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE		
		Thymus-extract × 1	B.A. 0,05 mg./cc.	Physiologisch zout
104	7 dagen	12	4	3
105	„	12	4	3
109	10 dagen	16	4	6
110	„	24	8	4

Resultaten van proef 4 in hoofdstuk IV. ACA-test met onverdund thymus-extract, bovine albumine oplossing 0,05 mg. per cc. en physiologisch zout bij cavia's, 7 en 10 dagen na implantatie van geconserveerd kalfsthymusweefsel. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 10

NUMMER PROEFDIER	IMPLAN-TAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
123	D.V.-bot	14	7	7	3
126	„	18	12	12	4
128	„	20	12	14	3
132	Controle	14	7	5	3
133	H_2O_2-bot	10	?	3	4
134	„	11	3	3	3
135	„	13	4	2	4
135a	Controle	14	3	3	3
111	Autoloog bot	9	2	4	4
112	„	8	7	8	3
118	„	9	7	2	3
119	Controle	13	9	—	1

Resultaten van proef 5 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract × 1, × 50 en × 100 bij cavia's, 7 dagen na implantatie van 4 pastilles van respectievelijk D.V.-bot, H_2O_2-bot en geconserveerd autoloog bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 10A

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
127	D.V.-bot	18	12	13	5
129	,,	17	11	12	4
124	,,	18	16	16	4
124a	Controle	13	6	3	6
136	H_2O_2-bot	18	16	8	4
137	,,	14	7	7	3
138	,,	18	16	13	5
138a	Controle	9	6	3	4
113	Autoloog bot	10	8	?	6
115	,,	12	8	5	7
116	,,	12	6	6	?
121	Controle	12	9	9	4

Resultaten van proef 5 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract × 1, × 50 en × 100 bij cavia's, 10 dagen na implantatie van 4 pastilles van respectievelijk D.V.-bot, H_2O_2-bot en geconserveerd autoloog bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 10B

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
125	D.V.-bot	18	13	14	4
130	,,	18	12	14	3
131	,,	20	13	13	4
132	Controle	11	5	6	3
139	H_2O_2-bot	11	5	5	4
140	,,	16	11	9	4
141	,,	16	5	8	2
142	Controle	15	4	4	4
114	Autoloog bot	5	5	2	4
117	,,	11	6	5	5
122	Controle	12	7	6	5

Resultaten van proef 5 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract × 1, × 50 en × 100 bij cavia's, 14 dagen na implantatie van 4 pastilles van respectievelijk D.V.-bot, H_2O_2-bot en geconserveerd autoloog bot. (Diameter kleurvlek in mm).

Tabel 11

NUMMER PROEFDIER	NEUTRAAL SERUM	D.V. 7 Serum	D.V. 10 Serum	D.V. 14 Serum
194	0	14	18	15
195	0	10	10	12

Resultaten van proef 5 in hoofdstuk IV. PCA-test met serum van cavia's, 7, 10 en 14 dagen na implantatie van 4 pastilles D.V.-bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 12

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
150	D.V.-bot	13	10	6	0
151	,,	15	9	0	2
152	,,	19	12	10	0
153	,,	15	9	11	0
154	,,	18	9	9	5
143	H_2O_2-bot A	12	5	1	0
144	,, A	14	13	9	0
145	,, A	10	2	0	2
147	,, B	15	1	0	4
148	,, C	14	9	7	0
149	,, C	8	9	0	0
A	Controle	9	6	5	4
B	,,	6	6	5	3
C	,,	11	6	5	4
E	,,	7	4	4	0

Resultaten van proef 6 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract ×1, × 50 en × 100 bij cavia's, 10 dagen na implantatie van 1 pastille van respectievelijk D.V.-bot en H_2O_2-bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 12A

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
161	D.V.-bot	14	8	8	1
163	,,	15	13	5	2
164	,,	17	12	12	0
165	,,	20	14	14	0
166	,,	18	12	13	0
155	H_2O_2-bot A	15	4	9	0
156	,, A	16	11	9	0
157	,, B	12	12	12	1
158	,, B	18	10	9	0
159	,, C	18	12	11	2
160	,, C	18	14	10	0

Resultaten van proef 6 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract ×1, × 50 en × 100 bij cavia's, 14 dagen na implantatie van 1 pastille van respectievelijk D.V.-bot en H_2O_2-bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 12B

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
173	D.V.-bot	15	11	14	3
174	,,	18	16	15	0
175	,,	16	12	9	0
176	,,	16	16	8	0
177	,,	16	12	8	0
178	,,	15	13	12	2
179	,,	17	10	11	1
167	H_2O_2-bot A	17	12	13	0
168	,, A	12	8	8	0
169	,, B	16	9	11	0
170	,, B	14	11	8	0
171	,, C	9	6	6	0
172	,, C	10	9	8	1

Resultaten van proef 6 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract ×1, × 50 en × 100 bij cavia's, 21 dagen na implantatie van 1 pastille van respectievelijk D.V.-bot en H_2O_2-bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 13

NUMMER PROEFDIER	Serum D.V. 10	Serum D.V. 14	Serum D.V. 21	Serum H_2O_2 10	Serum H_2O_2 14	Serum H_2O_2 21
196	16	20	20	0	12	13
197	12	20	18	0	16	14
198	10	12	18	0	10	12

Resultaten van proef 6 in hoofdstuk IV. PCA-test met serum van cavia's, 10, 14 en 21 dagen na implantatie van 1 pastille van respectievelijk D.V.-bot en H_2O_2-bot. (Diameter kleurvlek in mm.)

Tabel 14

NUMMER PROEFDIER	IMPLANTAAT	PROVOCERENDE INTRACUTANE INJECTIE			
		Thymus-extract			Physiologisch zout
		× 1	× 50	× 100	
186	H_2O_2-bot	11	4	1	3
187	„	5	3	1	4
188	„	9	3	?	1
189	„	11	4	6	0
190	„	10	3	4	1
191	„	12	1	1	0
180	Kiel-bot	12	9	6	0
181	„	16	9	5	0
182	„	17	8	8	1
183	„	11	8	4	0
184	„	6	11	5	3
185	„	10	7	7	1
192	Controle	8	1	0	0
193	„	9	3	0	0

Resultaten van proef 7 in hoofdstuk IV. ACA-test met thymus-extract × 1, × 50 en × 100 bij cavia's, 21 dagen na implantatie van 2 pastilles respectievelijk 2 × met H_2O_2 bewerkt kalfsbot en Kieler Span. (Diameter kleurvlek in mm.)

Variantie-analyse van de uitkomsten der ACA-test uit proef 5 hoofdstuk IV.

Waarnemingsuitkomsten: (P = D.V.-uitkomsten; C = H_2O_2-uitkomsten).

	7 dagen		10 dagen		14 dagen	
	P	C	P	C	P	C
	7	2	12	7	13	5
	12	3	13	8	14	8
	14	3	16	13	14	9
Gemiddeld	11	2,7	13,7	9,3	13,7	7,3

Uitkomsten van de variantie-analyse:

	V	S	S/V		
P-proef vs. C-proef	1	180,50	180,50		
Tijdstippen	2	72,44	36,22		
Rest	12	65,33	5,44	14	77,33 s^2 = 5,52
Interactie PC × T	2	12,00	6,00		
Totaal	17	330,27			

Deze analyse wijst uit:

1. De interactie is niet significant: de verschillen tussen P en C op de verschillende tijdstippen zijn ongeveer gelijkwaardig.
2. De C-proef waarden zijn zeer significant lager dan de P-proef waarden: $F_{(1:12)} = 180,5/5,52 = 32,70$; $P < 0,001$ (eenzijdig).
3. Het verschil tussen tijdstippen is significant bij een 5% drempel $F_{(2:14)} = 36,22/5,52 = 6,56$. Dit verschil is voornamelijk een gevolg van de lagere waarden bij 7 dagen.

Variantie-analyse van de uitkomsten der ACA-test uit proef 6 hoofdstuk IV.

Waarnemingsuitkomsten: (P = D.V.-uitkomsten; C = H_2O_2-uitkomsten).

10 dagen		14 dagen		21 dagen	
P	C	P	C	P	C
0	0	5	9	8	6
6	0	8	9	8	8
9	0	12	9	9	8
10	1	13	10	11	8
11	7	14	11	12	11
	9		12	14	13
				15	
Gemiddeld 7,2	2,8	10,4	10,0	11,0	9,0

Ook in dit geval is steeds het gemiddelde van de P-proef-groep hoger dan dat van de C-proef-groep. Het verschil is echter bij 14 dagen minder en bij 21 dagen klein. De variantie-analyse (waarbij rekening wordt gehouden met de verschillende aantallen waarnemingen in de groepen) levert de volgende uitkomsten op:

	V	S	S/V		
P-proef vs. C-proef	1	42,95	42,95		
Tijdstippen	2	192,07	96,03		
Rest	29	306,83	10,58	31	349,67 s^2 = 11,28
Interactie PC × T	2	42,84	21,42		
Totaal	34	584,69			

Deze analyse leidt tot de volgende uitspraken:

1. De interactie is niet significant: $F_{(2;29)} = 21{,}42/10{,}85 = 2{,}02$ (5% kritieke waarde = 3,33).
2. De C-proef waarden zijn significant lager dan de P-proef waarden: $F_{(1;31)} = 42{,}95/11{,}28 = 3.81$: $P < 0{,}03$ (eenzijdig).
3. Er is een verschil tussen de tijdstippen, dat significant is bij een 1% drempel; $F_{(2;31)} = 96{,}03/11{,}28 = 8{,}51$. Dit verschil is vooral een gevolg van de lagere waarden bij 10 dagen.

AFBEELDINGEN

Fig. 1. D.V.-bot voor implantatie (90 ×): Spongieus botweefsel. De botlacunes bevatten osteocyten. In het merg vele vetcellen en betrekkelijk weinig beenmergcellen.

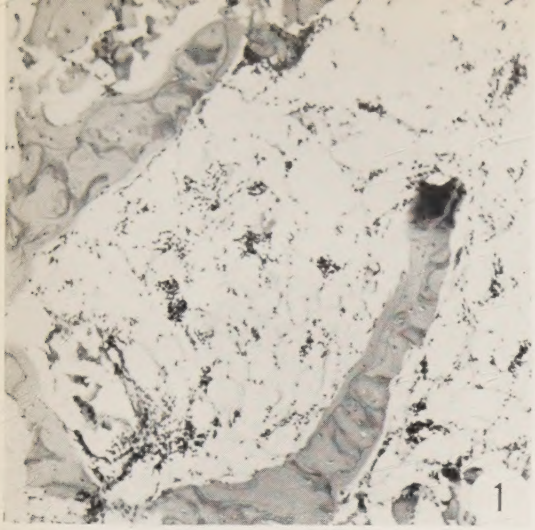
Fig. 2. H_2O_2-bot veór de implantatie (90 ×): Spongieuse botbalkjes. Botlacunes leeg. Geen resten van mergweefsel.

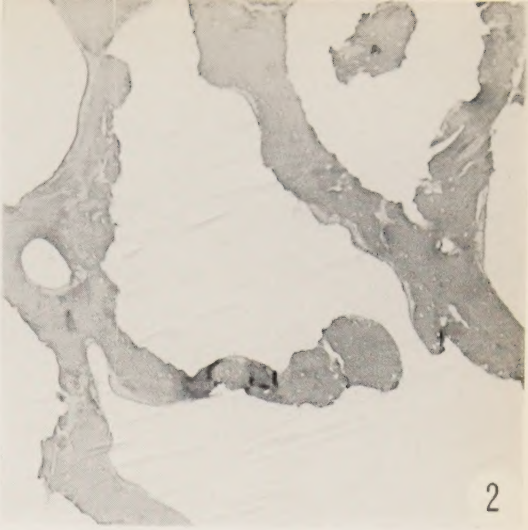
Fig. 3. Walvorming om D.V.-bot zeven dagen na de implantatie (90 ×): Laag van granulatieweefsel (A) tussen panniculus carnosus (B), en implantaat (C). Reuzencellen tegen botsubstantie.

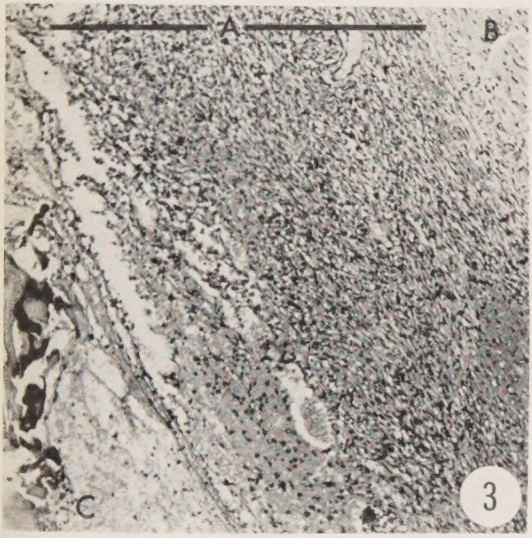
Fig. 4. H_2O_2-bot zeven dagen na implantatie (90 ×): De panniculus carnosus (A) ligt tegen het implantaat aan. Tussen de botbalkjes jong bindweefsel met begin van vezelvorming. De lege gebieden om de botbalkjes zijn kunstproducten, ontstaan door weefselschrompeling. Reuzencellen tegen de botbalkjes aan.

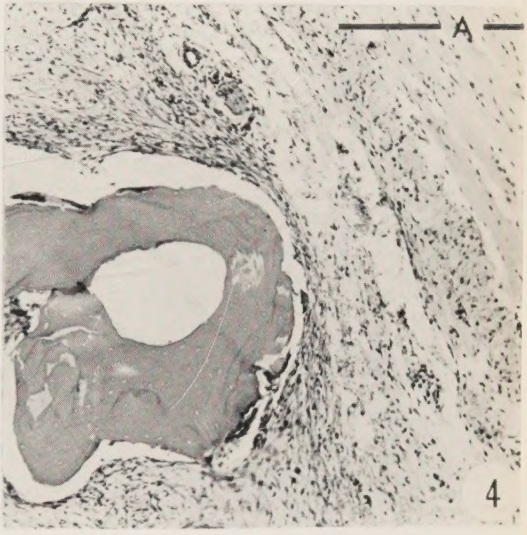
Fig. 5. Walvorming om D.V.-bot tien dagen na implantatie (90 ×): De laag granulatieweefsel tussen panniculus carnosus en implantaat is minder celrijk. Het gastheerweefsel dringt het merg van het implantaat binnen, maar omgroeit de vetcellen (A). Grote gebieden merg nog onveranderd (B).

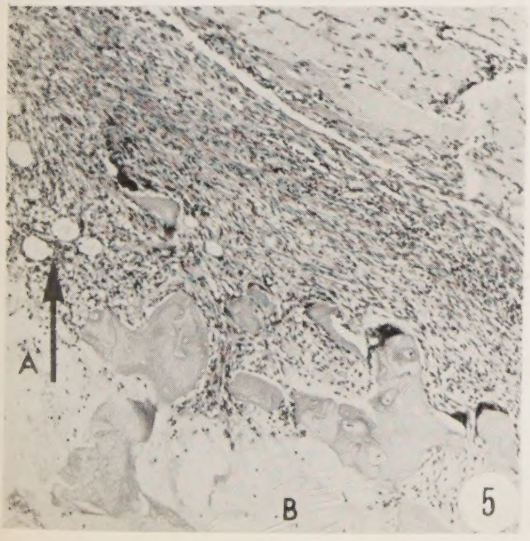
Fig. 6. H_2O_2-bot tien dagen na implantatie (90 ×): De spierlaag ligt direct tegen het implantaat aan. Het implantaat is volledig doorgroeid met vrij los bindweefsel. Reuzencellen tegen botbalkjes, zowel centraal als perifeer in het implantaat.


1


2


A
B
C
3


A
4


A
B
5

6